

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOSÉ EDUARDO BARONEZA

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE PACIENTES COM TENDINOPATIA PRIMÁRIA
DO TIBIAL POSTERIOR E DE PACIENTES COM CRANIOSSINOSTOSE NÃO
SINDRÔMICA

CURITIBA

2015

JOSÉ EDUARDO BARONEZA

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE PACIENTES COM TENDINOPATIA PRIMÁRIA
DO TIBIAL POSTERIOR E DE PACIENTES COM CRANIOSSINOSTOSE NÃO
SINDRÔMICA

Tese apresentada como requisito à obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular, Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Dra. Maria Cristina Leme Godoy dos Santos (UFPR)

Co-orientadora: Dra. Aline Pic-Taylor (UNB)

CURITIBA

2015

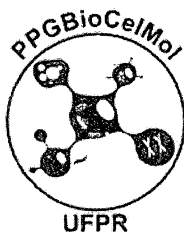
Baroneza, José Eduardo

Caracterização genética de pacientes com tendinopatia primária do tibial posterior e de pacientes com craniossinostose não síndrômica

Curitiba, 2015. 70p

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná – UFPR


1. Craniossinostose. 2. Tendinopatia do tibial posterior. 3. Genética molecular humana. 4. Microarranjos de DNA. 5. Patologias em tecidos de origem mesenquimal.




PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Instituto Carlos Chagas/Fiocruz/PR

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Prof. Dra. Maria Cristina Leme Godoy dos Santos
Orientadora e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Prof. Dra. Silviene Fabiana de Oliveira
Universidade de Brasília - UNB


Prof. Dra. Paula Cristina Trevilatto
Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUC-PR


Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Prof. Dr. Rubens Bertazzoli Filho
Universidade Federal do Paraná - UFPR

E tendo como suplentes,

Prof. Dr. Átila Fernando Visinoni
Universidade Positivo - UP

Prof. Dra. Livia Maria Rosatto Moda
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL

Após arguir o candidato **José Eduardo Baroneza**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Caracterização genética molecular de pacientes com craniossinostose não síndrômica e de pacientes com tendinopatia primária do tibial posterior", são de parecer favorável à **A. P. 20. VAGA** do acadêmico, habilitando-o ao título de Doutor em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 27 de Novembro de 2015.

O desenvolvimento deste trabalho foi possível devido ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF).

“Através dos outros, nos tornamos nós mesmos” (Lev Semenovitch Vygotsky). Por meio desta frase dedico este trabalho à minha família, aos meus alunos, professores, orientadores e colegas de graduação e pós-graduação.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Maria Cristina Leme Godoy dos Santos, pela orientação, paciência e confiança que teve em mim durante a execução deste trabalho.

À Professora Dra. Aline Pic-Taylor, da Universidade de Brasília, por ter me co-orientado na execução de técnicas importantes sem as quais este trabalho não seria possível.

Às professoras Dras. Juliana Forte Mazzeu de Araújo e Silviene Fabiana de Oliveira, da Universidade de Brasília, pelas trocas estabelecidas, críticas construtivas, apoio e colaboração na parte do projeto que envolve pacientes com craniossinostose.

Aos meus orientadores de mestrado e de iniciação científica, Prof. Dr. Ricardo Guelerman Pinheiro Ramos, da Universidade de São Paulo, e Profa. Dra. Maria José Sparça Salles, da Universidade Estadual de Londrina, pelo conhecimento compartilhado e pelo exemplo de responsabilidade e sucesso.

Aos voluntários que cederam material biológico para as análises realizadas.

Aos professores e colegas da pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná e do departamento de Morfologia e Genética da Universidade de Brasília, pelo convívio, pelas trocas, pelas críticas e pelas risadas.

Aos meus pais João Batista Baroneza e Neusa Maria Lombardi Baroneza, pelo incentivo e amor incondicional e por não medir esforços para que meus objetivos fossem atingidos.

Ao meu companheiro de vida, Dr. Márcio Adriano Anselmo, por não me deixar desistir, por estar sempre ao meu lado, pelo exemplo de integridade e de superação de vida.

Aos meus colegas de trabalho na Universidade Positivo, em especial às amigas Profa. Dra. Tatiana Herrerias, Profa. Dra. Tatiane Herreira Trigueiro e Prof. Ms. Deberli Ruiz Fernandes por fazerem o meu dia a dia mais feliz.

Aos meus alunos, inspiração maior da minha vida.

RESUMO

Patologias do tecido conjuntivo estão entre as mais comuns desde a infância até a idade adulta. Por muito tempo, as pesquisas sobre estas doenças se basearam em descrever a epidemiologia e o quadro clínico, do ponto de vista da evolução, do tratamento e das consequências para os portadores. Neste trabalho, estudamos geneticamente indivíduos portadores de duas patologias importantes que afetam tecido conjuntivo: a tendinopatia primária do tibial posterior e a craniossinostose. As tendinopatias resultam de desarranjos na matriz extracelular tendínea que ocasiona disfunção do tecido conjuntivo denso e consequente dificuldade de movimentos. A craniossinostose, por sua vez, é uma das mais graves anormalidades do desenvolvimento e resulta da ossificação precoce de uma ou mais suturas entre os ossos cranianos. Mediante parceria com o Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo foram selecionadas 50 mulheres com tendinopatia primária do tibial posterior submetidas a tratamento cirúrgico, com a doença confirmada por exame histopatológico (degeneração mixóide associado à proliferação vascular multifocal) e por imagem de ressonância magnética (T2 mostrando sinal intermediário de intensidade e espessamento do tendão) e 100 mulheres assintomáticas na topografia do tendão, que não mostram mudanças de sinal na ressonância magnética. Análise genotípica por PCR-RFLP foi realizada para avaliar a influência do polimorfismo -519 (rs1144393) do *MMP-1* isoladamente e em haplótipo com o polimorfismo -1607 (rs1799750) também do *MMP-1* na insuficiência primária do tendão tibial posterior. Em parceria com os Laboratórios de Biologia do Desenvolvimento e de Genética Humana do Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília genomas de 13 casos de craniossinostose, inicialmente caracterizados como não sindrômicos, foram estudados por meio de análise cromossômica por microarranjo de DNA (CGH-Array) utilizando a plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix) no intuito de investigar a presença de rearranjos cromossômicos submicroscópicos. Nossos resultados mostram que o alelo G do polimorfismo -519 da *MMP-1* aumenta a susceptibilidade à tendinopatia do tibial posterior ($p \leq 0,01$). Análise de haplótipos dos polimorfismos -519 e -1607 da *MMP-1*

indicou uma diferença significativa entre os dois grupos ($p \leq 0,0001$). Haplótipos G-2G e A-2G parecem ser fator de risco (G-2G, $p < 0.001$; OR = 5.72 (CI, 2.84–11.52) e A-2G $p = 0.002$, OR = 3.95 (CI, 1.65–9.44). Em relação ao estudo molecular de pacientes com craniossinostose verificamos em dois pacientes duplicação parcial distal do braço longo do cromossomo 1, sugerindo um possível papel dos genes relacionados às proteínas morfogenéticas WNT9A, WNT3A e do regulador de sinalização por proteínas G-7 (RGS7) na etiologia de malformações das suturas cranianas. Com isso identificamos marcadores genéticos relacionados à tendinopatia primária do tibial posterior e à craniossinostose, aumentando o conhecimento molecular a respeito da etiologia de tipos diferentes de patologias do tecido conjuntivo propriamente dito.

Palavras-chave: Tendinopatia do tibial posterior. Craniossinostose. MMP-1. Duplicação parcial em 1 q. PCR-RFLP. CGH-ARRAY.

ABSTRACT

Connective tissue diseases are common from childhood to adulthood. For a long time, research on these diseases were based on describe the epidemiology and clinical features related to the development, treatment and consequences for patients. We studied genetically individuals with two important diseases that affect connective tissue: the primary tendinopathy of the posterior tibial and craniosynostosis. Tendinopathies result of tendon extracellular matrix breakdowns that cause dysfunction of dense connective tissue and consequent difficulty in movement. Craniosynostosis is one of the most severe developmental abnormalities and results from one or more sutures early ossification between the cranial bones. Through a partnership with the Department of Orthopedics and Traumatology of the Faculty of Medicine of the São Paulo University, were selected 50 women with primary tendinopathy of the posterior tibial treated surgically and with the disease confirmed by histopathology (myxoid degeneration associated with multifocal vascular proliferation) and magnetic resonance imaging (T2 showing intermediate signal intensity and thickening tendon) and 100 asymptomatic women in the tendon topography and show no sign changes in magnetic resonance imaging. Genotypic analysis by PCR-RFLP was performed to evaluate the influence of the -519 polymorphism (rs1144393) MMP-1 alone and in haplotype with the -1607 polymorphism (rs1799750) also on the MMP-1 in the etiology of primary failure of the posterior tibial tendon. In partnership with the Developmental Biology and Human Genetics Laboratories of the Department of Genetics and Morphology of the University of Brasilia, genomes of 13 cases of craniosynostosis, initially characterized as non-syndromic, were studied by DNA microarray human chromosome analysis (CGH-Array) using the Cytoscan platform 750k (Affymetrix) in order to investigate the presence of submicroscopic chromosomal rearrangements. Our results show that the G allele of the -519 polymorphism of MMP-1 increases the susceptibility of the posterior tibial tendinopathy ($p \leq 0.01$). Haplotype Analysis of the -519 and -1607 polymorphism of MMP-1 indicated a significant difference between the two groups ($p \leq 0.0001$). Haplotypes G-A-2G and 2G appear to be a risk factor (G-2G, $p < 0.001$; OR = 5.72 (CI, 2.84-11.52) and A-2G $p = 0.002$, OR = 3.95 (CI, 1.65-9.44). Regarding the molecular study of patients with craniosynostosis looked at two distal

partial duplication patients throughout the chromosome 1 arm, suggesting a possible role of genes related to morphogenetic proteins WNT9A, WNT3A and the signaling regulator of G-7 protein (RGS7) in the etiology of cranial sutures development. We identified genetic markers related to primary tendinopathy of the posterior tibial and craniosynostosis, increasing molecular knowledge about the etiology of different types of connective tissue disorders itself.

Key-words: Posterior tibial tendinopathy. Craniosynostosis. MMP-1. Partial 1 q duplications.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 HIPOTESE	22
3 OBJETIVO GERAL	23
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4 METODOLOGIA	24
4.1 AVALIAÇÃO GENÉTICA DE PORTADORES DE TENDINOPATIA DO TIBIAL POSTERIOR	24
4.2 AVALIAÇÃO GENÉTICA DE PORTADORES DE CRANIOSSINOSTOSE NÃO SINDRÔMICA	27
5 CAPITULO I	34
6 CAPITULO II	39
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
APÊNDICES	62
ANEXOS	63

1 INTRODUÇÃO

O tecido conjuntivo é o mais abundante entre os que constituem os animais. É originado a partir da diferenciação do mesoderma e do neuroectoderma embrionário e entre seus subtipos estão o conjuntivo propriamente dito, o ósseo, o cartilaginoso, o sanguíneo, o hematopoiético, o adiposo, o elástico, o mucoso e o mesenquimal. Nestes, existe em comum uma rica matriz extracelular, constituída por moléculas variadas, entre as quais se destacam as proteínas fibrosas, as proteoglicanas e as glicoproteínas, que são secretadas localmente e reunidas em uma rede organizada e em estreita associação com a superfície das células que as produzem (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; ALBERTS, *et al.*, 2010). Em condições fisiológicas normais, a manutenção destas moléculas é regulada por diversos mediadores tais como citocinas, fatores de crescimento e metaloproteases de matriz extracelular (MMPs) (ALEXANDER *et al.*, 1991).

Além de promover a conexão entre os outros tipos de tecidos do corpo atribui-se também ao tecido conjuntivo as funções relacionadas ao suporte estrutural e mecânico do organismo, transporte de fluidos, reserva de nutrientes e a promoção de um sítio ideal para a migração e comunicação celular. Na presença de patologias, os constituintes do conjuntivo estão relacionados à cicatrização de feridas, por meio da proliferação celular e síntese de moléculas de preenchimento, e à imunidade contra patógenos, em razão da presença de células locais apresentadoras de antígenos e secretoras de mediadores da inflamação (CLARK 1996). No desenvolvimento embrionário e na diferenciação celular as moléculas da matriz extracelular estão relacionadas à promoção da diferenciação, maturação e divisão celular (ROZARIO; DeSIMONE, 2010)

Diferente das propriedades dos tecidos epitelial, muscular e nervoso, que dependem principalmente de suas células, a abundância de moléculas da matriz extracelular no tecido conjuntivo a torna essencial para a funcionalidade do tecido. As doenças que acometem os tecidos conjuntivos são comuns desde a infância até a idade adulta e tendem a apresentar graus variáveis de risco para a saúde. Entre as anormalidades conjuntivas encontram-se lesões celulares e fibrosas, inflamações, edemas, neoplasias, calcificações e acúmulos diversos (RUBIN; FARBER, 2002).

Por muito tempo os estudos sobre estas doenças se basearam em descrever a epidemiologia e o quadro clínico quanto à evolução, o tratamento e as consequências para os portadores. Algumas destas condições permanecem idiopáticas. Entretanto, o avanço das tecnologias de pesquisa e a decodificação completa do genoma humano e de outros modelos animais têm permitido elucidar a origem das doenças que afetam os tecidos conjuntivos. Com isso, hoje sabemos que estas doenças podem ter origem genética, ambiental ou multifatorial, como por exemplo em consequência da associação de anormalidades genéticas com infecções, traumas, autoimunidade, exposição à radiação e agentes xenobióticos, entre outros fatores que podem atuar isoladamente ou em conjunto (WINFIELD *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, as pesquisas em genética, biologia celular, molecular e do desenvolvimento têm aumentado o conhecimento em relação às doenças do tecido conjuntivo que são influenciadas geneticamente (MURPHY-RYAN *et al.*, 2010). A ciência experimental colhe frutos de pesquisas que detalharam genética e molecularmente a origem e o desenvolvimento de patologias que envolvem anormalidades conjuntivas. Como consequência, por exemplo, a relação da genética com as tendinopatias se tornou evidente através de estudos como o de Mokone e colaboradores (2005), o qual relacionou o polimorfismo no gene da tenascina-C com a tendinopatia do tendão calcâneo. A partir desse momento, diversos autores mostraram a associação entre polimorfismos genéticos e as tendinopatias, estudando diferentes genes como os que expressam fator transformador de crescimento, fator de diferenciação de crescimento, fator de crescimento de fibroblastos e seus receptores, proteína morfogenética óssea, beta-defensina, interleucinas, diferentes tipos de colágeno e metaloproteases (TABELA 1).

TABELA 1 – Histórico de trabalhos onde foi analisada a associação de polimorfismos genéticos com tendinopatia.

Tendão	Gene-polimorfismo	População	Referências
Quadríceps	<i>COL5A1</i> -rs12722	Um – relato de caso Itália	<i>GALASSO et al;</i> 2012
	<i>COL5A1</i> - rs12722	Um – relato de caso Itália	<i>LONGO et al;</i> 2010
Tibial posterior	<i>MMP1</i> -rs1144393	50 casos e 100 controles Brasil	<i>BARONEZA et al;</i> 2014
	<i>MMP8</i> -rs1320632	50 casos e 100 controles Brasil	<i>GODOY-SANTOS et al;</i> 2013
Ligamento cruzado anterior	<i>MMP3</i> -rs3025058	40 esportistas, 46 não esportistas Tailândia	<i>MALILA et al;</i> 2011
	<i>COL5A1</i> -rs12722; rs13946	129 casos e 216 controles África do Sul	<i>POSTHUMUS et al;</i> 2009
	<i>COL1A1</i> -rs1800012	117 casos e 130 controles África do Sul	<i>POSTHUMUS et al;</i> 2009
	<i>COL1A1</i> -Sp1 G/T	358 casos e 325 controles África do Sul	<i>KHOSCHNAU et al;</i> 2008
Achilles	<i>BMP4</i> -rs2761884 <i>FGF3</i> -rs12574452	52 casos e 86 controles Brasil	<i>SALLES et al;</i> 2013
	<i>COL11A1</i> -rs3753841 <i>COL11A2</i> -rs1676486 <i>COL2A2</i> -rs1799907	184 casos e 338 controles África do Sul e Austrália	<i>HAY et al;</i> 2013
	<i>TIMP2</i> -rs1054480 <i>ADAMTS14</i> -rs4747096	175 casos e 247 controles África do Sul e Austrália	<i>KHOURY et al;</i> 2013
	<i>IL-1β</i> -rs1143627 <i>IL-1β</i> -rs16944 <i>IL-6</i> -rs1800795	369 casos e 175 controles África do Sul e Austrália	<i>SEPTEMBER et al;</i> 2011
	<i>ALOX5AP</i> -rs17222814; rs17216473; rs10507391; rs4769874, rs9551963; rs9315050; rs17222842	945 casos Holanda	<i>OOSTERVEER et al;</i> 2009
	<i>MMP3</i> -rs679620; rs591058; rs650108 <i>COL5A1</i> -rs12722	114 casos e 98 controles Reino Unido	<i>RALEIGH et al;</i> 2009
	<i>COL5A1</i> -rs12722; rs13946; rs10858286; rs3196378; rs11103544; rs4504708; rs3128575	85 casos e 210 controles Australia 93 casos e 132 controles África do Sul	<i>SEPTEMBER et al;</i> 2009
	<i>COL1A1</i> -rs1800012	85 tendinopatia e 41 rupturas África do Sul	<i>POSTHUMUS et al;</i> 2009
	<i>COL12A1</i> - rs240736; rs970547 <i>COL14A1</i> - rs4870723; rs1563392 <i>COL5A1</i>	93 tendinopatia e 43 rupturas África do Sul 72 tendinopatia, 39 rupturas e 129 controles África do Sul	<i>SEPTEMBER et al;</i> 2008 <i>MOKONE et al;</i> 2006
	<i>TNC</i> (tenascina C)	114 casos e 127 controles África do Sul	<i>MOKONE et al;</i> 2005
	<i>LDLR</i> (Receptor de LDL)	17 famílias Japão	<i>YAMAKAWA et al;</i> 1991.

Outros estudos demonstraram que o fechamento das suturas cranianas depende da expressão de genes que codificam moléculas tais como a ameloblastina, o fator de transcrição relacionado à Runt do tipo 2, proteína morfogenética óssea, Indian Hedgehog, fator de crescimento tumoral do tipo beta, colágeno, fator de crescimento de fibroblastos e seus receptores do tipo 1 e do tipo 2, entre outros (TABELA 2). Estas análises têm proporcionado uma melhor compreensão das doenças do conjuntivo e podem auxiliar o desenvolvimento de terapias que atuem seletivamente nas moléculas alteradas e em genes alvo no DNA, aumentando a eficiência dos tratamentos convencionais e diminuindo os efeitos colaterais (METZGER *et al.*, 2006).

TABELA 2: Genes relacionados com moléculas indutoras e fatores de transcrição que participam da diferenciação celular no desenvolvimento de suturas.

Fonte Indutora	Genes	Conclusões	Referências
Dura-máter	<i>FGF2; TGF</i>	Faltam estudos subsequentes	Slater <i>et al</i> ; 2009
Osteoblastos	<i>FGF</i>	Mutações em FGFR2 estão relacionadas à	Wilkie <i>et al</i> ; 2001
	<i>MSX-2</i>	craniossinostose síndrômica. Mutações estão relacionadas à	Jabs <i>et al</i> ; 1993
	<i>RUNX2</i>	craniossinostose síndrômica. Relacionado à diferenciação do	Greives <i>et al</i> ; 2013
		osteoblasto ¹ ; quando	Lian <i>et al</i> ; 2013
	<i>TGFβ</i>	quadruplicado associado a craniossinostose multisutural ²	
		A expressão de TGFβ2 exerce papel na craniossinostose em	Opperman <i>et al</i> ; 1997
Osteoclasto	<i>BMP3</i>	coelhos ¹ . Alta expressão de TGFβ3 está relacionada ao	Rott <i>et al</i> ; 1997
		fechamento sutural ² .	
	<i>IHH</i>	Baixa expressão está relacionada ao fechamento	Nacamuli <i>et al</i> ; 2005
		sutural precoce	
		Exerce papel de molécula	Jacob <i>et al</i> ; 2007
		sinalizadora na craniossinostose em	
	<i>RANK</i>	camundongos	
		A expressão do receptor RANK	Lee <i>et al</i> ; 2011
		pelo osteoclasto e sua	
		interação com o ligante RANK-	
		L do osteoblasto é fundamental	
		para a sobrevivência do	
		osteoclasto nas margens das	
		suturas.	
	<i>TRAF6</i>	Alta expressão relacionada a	Beederman <i>et al</i> ; 2014
		craniossinostose	

Neste trabalho, nossa proposta foi, por meio de um projeto interinstitucional, buscar fatores genéticos relacionados a doenças do tecido conjuntivo com sugestão de etiologia genética a partir da análise de pacientes afetados. Para tanto, escolhemos duas patologias que envolvem o tecido conjuntivo denso derivado do mesênquima: 1. a tendinopatia do tendão tibial posterior, que está associada ao pé plano adquirido no adulto, onde se observa significativa perda da função deste tendão e dor crônica; e 2. a craniossinostose, que decorre da ossificação precoce das suturas localizadas entre os ossos craniais com consequências que vão desde alterações anatômicas na caixa craniana até anormalidades neurológicas e faciais.

A insuficiência do tendão tibial posterior causa significativa perda funcional, dor e osteoartrose secundária das articulações do retropé (POMEROY *et al.*, 1999). Ocorre com uma frequência três vezes maior no sexo feminino, com média de idade para início dos sintomas aos 40 anos e é mais comum em euroderivadas, obesas e hipertensas (DELAND *et al.*, 2005). Diversos fatores etiológicos são propostos para explicar a síndrome, tais como: a presença de pé plano congênito (MANN, 1993; FUNK *et al.*, 1986), o impacto no túnel osteofibroso (JAHSS, 1991), a presença do osso navicular acessório (KIDNER, 1933), a região hipovascular do tendão (FREY *et al.*, 1990, HOLMES; MANN, 1992) e a demanda mecânica aumentada (POMEROY *et al.*, 1999). Entretanto, o conhecimento dos fatores mecânicos, vasculares e neurológicos apresentam alcance limitado na explicação etiológica de muitos casos (RILEY, 2004).

Características individuais podem predispor a lesões do aparelho locomotor, sugerindo que fatores intrínsecos do paciente desempenham papel etiológico importante. Assim, parece existir um grupo de indivíduos com carga genética que lhes confere maior suscetibilidade para desenvolver doenças do tendão (POSTHUMUS *et al.*, 2009a; COLLINS; RALEIGH, 2009).

Alguns autores já demonstraram a influência de polimorfismos genéticos nas tendinopatias e provavelmente esses influenciam a degeneração tendínea por meio do efeito acumulado de múltiplos polimorfismos, envolvendo interações complexas entre diversos genes (ADAMO *et al.*, 2001). Entretanto, para entender a importância de cada alelo polimórfico, é necessário avaliar a contribuição de cada polimorfismo no fenótipo da doença (MAGRA; MAFULLI, 2008).

O trabalho de Mokone e colaboradores (2005) foi um dos primeiros a demonstrar que patologias de tendão podem ser explicadas, ao menos

parcialmente, por alterações genômicas. A análise de um microsatélite no gene da tenascina-C, caracterizado pela repetição de uma sequência de guanina-timina (GT), indicou que os indivíduos com os alelos de 12 e 14 repetições apresentam um risco seis vezes maior de desenvolver lesões no tendão calcâneo - tendão de Aquiles. Nos últimos 10 anos, diversos estudos comprovam a influência da etiologia da insuficiência dos tendões, tal como ocorre na tendinopatia do tendão de Aquiles (SEPTEMBER *et al.*, 2009; COLLINS; RALEIGH, 2009; RALEIGH *et al.*, 2009; POSTHUMUS *et al.*, 2010; HAY *et al.*, 2013; EL KHOURY *et al.*, 2013), na ruptura e insuficiência do ligamento cruzado anterior (POTHUMUS *et al.*, 2009b; MALILA *et al.*, 2011; FICK *et al.*, 2013; STEPIEN-SLODKOWSKA *et al.*, 2013; STEPIEN-SLODKOWSKA *et al.*, 2015), na doença do manguito rotator (MOTTA *et al.*, 2014; TEERLINK *et al.*, 2014) e na síndrome do túnel carpal relacionada ao tendão dos flexores (BURGER *et al.*, 2014 e 2015).

Nosso grupo foi o primeiro a estudar a associação de marcadores genéticos e a tendinopatia do tibial posterior. Nós mostramos que o polimorfismo único de nucleotídeo (SNP) C-799T (rs11225395) no gene da MMP-8 está associado com tendinopatia primária do tibial posterior (GODOY-SANTOS *et al.*, 2014). Os resultados sugerem que os indivíduos com o alelo T tem um risco maior de desenvolver esta tendinopatia. Em outro estudo (GODOY-SANTOS *et al.*, 2013), o SNP rs1799750 no gene da MMP-1, o qual é caracterizado pela inserção de uma base guanina (G) na posição -1607, criando dois alelos diferentes (1G ou 2G), também foi associado com insuficiência do tibial posterior na mesma população, sendo o alelo 2G um fator de risco. Os resultados confirmam um papel importante das metaloproteases no processo da tendinopatia.

Coletivamente, esses estudos sugerem que, quando testados individualmente, a variabilidade genética pode influenciar a tendinopatia e explicar alguns dos fatores de risco inter-individuais. No entanto, quando vários polimorfismos dentro de um ou vários genes são estudados simultaneamente, em haplótipo e em combinação, os resultados têm o potencial de ser muito mais robusto e revelar o efeito aditivo de polimorfismos.

Além disso, a MMP-1 tem atividade enzimática sobre todos os tipos de colágeno, especialmente sobre a tripla helice dos colágenos I e III (VINCENTI *et al.*, 1996) componentes importantes do tendão tibial posterior e que se mostram

alterados na tendinopatia do tibial posterior. Acreditamos que polimorfismos em *MMP-1* podem alterar o padrão de colágenos do tibial posterior levando a um risco maior do desenvolvimento de tendinopatia.

Diante disso, julgamos interessante o estudo de polimorfismos em *MMP-1*, isoladamente e em haplótipo, buscando identificar possíveis marcadores genéticos relacionados à tendinopatia. O interesse do grupo é catalogar diferentes polimorfismos relacionados com a tendinopatia primária, uma vez que o perfil genômico possibilita a identificação de indivíduos susceptíveis e auxilia a compreensão desta patologia.

Em relação às craniossinostoses, ou cranioestenoses, resultado da ossificação precoce de uma ou mais suturas craniais, existem muitos casos com o componente genético desconhecido.

As craniossinostoses são anomalias craniofaciais que podem acometer o indivíduo desde a vida intrauterina. A patologia se deve ao adiantamento da ossificação intramembranosa ou endocondral dos ossos chatos do crânio e pode aparecer como um transtorno isolado ou como manifestação componente de uma forma sindrômica (BEEDERMAN *et al.*, 2014). Quando uma sutura se fecha prematuramente, o crânio não cresce na direção perpendicular a sutura afetada, o que resulta em deformidades cranianas. O tipo da deformidade dependerá de qual sutura foi fechada prematuramente (Apêndice 1). Estas patologias são anormalidades comuns do desenvolvimento craniofacial e constituem uma importante causa de morbidade infantil (WILKIE *et al.*, 2001).

A forma não sindrômica de craniossinostose é a mais prevalente, 70-85% dos casos, e normalmente está associada à ossificação precoce de apenas uma sutura (MARSH *et al.*, 2006). Quanto à etiologia são descritos casos de natureza ambiental, multifatorial e genética. Forças mecânicas anormais no crânio em desenvolvimento, como a compressão do útero (HIGGINBOTTOM *et al.*, 1980) e uso do anticonvulsivante ácido valpróico durante o início da gravidez (VALENTIN *et al.*, 2008; CHABROLLE *et al.*, 2001) estão relacionados à etiologia ambiental de alguns casos já descritos.

A craniossinostose não sindrômica pode ainda estar associada a anormalidades genéticas raras (ROJAS-PEÑA *et al.*, 2014; LAJEUNIE *et al.*, 1995).

ROJAS-PENÑA e colaboradores (2014) sugerem que o padrão de expressão gênica na craniossinostose não síndrômica é heterogêneo e complexo.

Os estudos moleculares já realizados têm evidenciado a influência de mutações em genes relacionados com o controle do desenvolvimento e a diferenciação celular, o que é esperado uma vez que as suturas cranianas são estruturas anatômicas temporárias que devem se diferenciar de tecido conjuntivo propriamente dito denso modelado a tecido ósseo ao longo da infância.

A análise de 26 pacientes com craniossinostose do tipo braquicefalia revelou uma mutação no gene do Receptor do Fator de Crescimento do Fibroblasto do tipo 3 (FGFR3), região P250R, em 8 indivíduos (MOLONEY *et al.*, 1997). Outro estudo relatou mutação pontual em *FGFR2*, região A315S, em paciente com craniossinostose do tipo plagiocefalia (JOHNSON *et al.*, 2000). Em avaliação de 29 portadores de craniossinostose do tipo escafocefalia foi constatada mutação pontual em *FGFR2*, região A315T, em um dos avaliados (WEBER *et al.*, 2001). Mutações no gene da efrina A-4 (*EFNA4*), regiões H60Y e P117T, foram reportadas em paciente com fechamento precoce na sutura coronal (PASSOS-BUENO *et al.*, 2008; MERRIL *et al.*, 2006).

Os pacientes envolvidos neste estudo são portadores da forma de craniossinostose denominada de trigonocefalia, que decorre do fechamento precoce das suturas metópicas. Pacientes com esta doença já foram descritos como portadores de mutação pontual em *FGFR1*, região I300T, (KRESS *et al.*, 2000), microdeleção no gene do receptor da proteína tirosina fosfatase tipo D (*PTPRD*) (CHOUCAIR *et al.*, 2015), microdeleção no gene regulador de sinalização por proteínas G-7 (*RGS7*) (MEFFORD *et al.*, 2010), deleções parciais em 11q (LEWANDA *et al.*, 1995), 9p (CHRIST *et al.*, 1999), 7p (CHOTAI *et al.*, 1994) e 9q (MEFFORD *et al.*, 2010) e duplicação parcial em 6p (MEFFORD *et al.*, 2010). Entretanto, muitos portadores de craniossinostose não apresentam as mutações acima descritas, o que caracteriza a complexidade que envolve a diferenciação celular durante a morfogênese sutural e a necessidade de novos estudos.

Embora até o momento não haja evidências da associação de craniossinostose em humanos com mutações em genes da família wingless-type (*WNT*), reconhecidos por codificar proteínas morfogenéticas importantes para o

desenvolvimento de derivados do tecido conjuntivo (CADIGAN; NUSSE, 1997), nós acreditamos que mutações nestes genes podem estar relacionadas a esta doença. A expressão de *WNT9A* em osteoblastos no crânio em desenvolvimento foi relatada em trabalho desenvolvido por Zhou *et al.*, (2009). Esta molécula atua via sinalização parácrina e está associada à fusão dos processos palatinos medianos na formação da face (DOUGHERTY *et al.*, 2013), ao desenvolvimento de primórdios cartilaginosos na morfogênese da mandíbula (CURTIN *et al.*, 2011), e pode induzir à diferenciação de cartilagem ectópica na sutura sagital, quando expressa de forma anômala (SPATER *et al.*, 2006). Além disso, outro membro da família *WNT*, o *WNT3A*, quando injetado acima da calvária em desenvolvimento resultou em completa degradação da cartilagem e ossificação precoce em camundongos (ZHOU *et al.*, 2009).

Neste trabalho fizemos o uso de distintas tecnologias no intuito de encontrar respostas a respeito de alterações genéticas em humanos portadores de doenças do tecido conjuntivo. O estudo da genética da craniossinostose envolveu a técnica do microarranjo (*microarray*), uma das mais modernas entre as utilizadas para a triagem e mapeamento de alterações cromossômicas submicroscópicas. A análise da tendinopatia do tibial posterior, por sua vez, ocorreu por meio de técnicas clássicas tais como a PCR (reação em cadeia da polimerase) e o RFLP (polimorfismos no comprimento de fragmentos de restrição).

2 HIPÓTESE

De acordo com a literatura atual, a descrição etiológica de muitas doenças dos tecidos conjuntivos humanos tem sido revista e atualizada. Sabe-se que a tendinopatia do tibial posterior e a craniossinostose são doenças que apresentam um componente de natureza genética importante. Posto isso, a hipótese desta tese é que ambas as patologias apresentam fatores genéticos ainda desconhecidos. Em relação à tendinopatia do tibial posterior, tendo como base estudos preliminares, acreditamos que a doença pode estar associada a polimorfismos em genes que controlam a organização da matriz extracelular tendínea, como o que codifica a metaloprotease de matriz extracelular do tipo 1 (MMP-1). No que se refere à craniossinostose, nossa hipótese é que genes relacionados ao controle da diferenciação celular no tecido conjuntivo possam estar mutados e devem ser analisados em pacientes portadores desta anomalia.

3 OBJETIVOS GERAIS

Analisar geneticamente portadores de tendinopatia primária do tibial posterior e portadores de craniossinostose não síndrômica.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Possibilitar o intercâmbio científico entre a Universidade Federal do Paraná, a Universidade de São Paulo e a Universidade de Brasília.
- b) Investigar a influência de polimorfismos na região promotora do gene da MMP-1 (rs1144393), na insuficiência primária do tendão tibial posterior.
- c) Investigar a combinação haplotípica dos polimorfismos -1607 e -519 (rs1799750 e rs1144393) da MMP-1 e o risco de tendinopatia primária no tibial posterior em mulheres.
- d) Contribuir para a identificação de novas regiões genômicas associadas à craniossinostose.

4 METODOLOGIA

4.1 AVALIAÇÃO GENÉTICA DE PORTADORES DE TENDINOPATIA DO TIBIAL POSTERIOR

4.1.1 Aprovação em Comitê de Ética em Pesquisa

O protocolo experimental foi avaliado e aprovado pela Comissão Científica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) sob o número 708, pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPESQ) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o número 0901/09 e pela Comissão Científica da Universidade Federal do Paraná sob o número 200923474 (ANEXO 1).

4.1.2 Seleção dos pacientes

150 pacientes do Grupo de Pé e Tornozelo do Departamento de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo foram recrutados para este trabalho. Estes pacientes foram identificados segundo idade, sexo, índice de massa corpórea, diagnóstico da doença, antecedentes pessoais de doenças sistêmicas e infecciosas, antecedentes familiares de doenças inflamatórias e informação sobre a presença prévia de pé plano. Após explicação sobre os objetivos do trabalho os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 2).

Foram divididos em dois grupos: **Grupo-Teste:** 50 mulheres com diagnóstico clínico e anatomopatológico de lesão degenerativa primária do tendão tibial posterior. **Grupo-Controle:** 100 mulheres assintomáticas e com tendão tibial posterior íntegro na ressonância magnética.

Pacientes de ambos os grupos apresentaram boas condições sistêmicas e ausência dos seguintes critérios de não inclusão: doença reumatológica, imunológica, diabetes, doença hepática e renais, infecções ou lesão previa ou atual na topografia do pé e tornozelo, obesidade superior ao grau I, sexo masculino.

O estudo do polimorfismo genético foi realizado no Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná. O grupo de pesquisadores de

processamento do material celular não teve conhecimento do grupo ao qual fazia parte o voluntário.

4.1.3 Obtenção e Extração do DNA

O DNA dos pacientes foi obtido a partir de células epiteliais da mucosa bucal de acordo com o procedimento descrito por TREVILATO e LINE (2007). O material foi transportado por empresa credenciada, conforme o Procedimento Operacional Padrão da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. A extração do DNA foi realizada conforme protocolo de AIDAR e LINE (2007). Após extração, o DNA foi mensurado por espectrofotometria na densidade ótica de 260/280 nm.

4.1.4 PCR e RFLP

O genótipo MMP-1 foi determinado pelos métodos de PCR e RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Os oligonucleotídeos iniciadores de PCR utilizados para amplificar a região de interesse de MMP-1 foram: *Foward*: 5'-CATGGTGCTATCGCAATAGGGT-3' e *Reverse*: 5'-TGCTACAGGTTTCTCCACACAC-3'.

A reação de PCR foi realizada num volume final de 15 μ L, contendo aproximadamente 400 ng de DNA, 8 μ L de taq Green (Amersham Pharmacia-Biotech, Uppsala, Sweden) e 200pmol de cada primer. Uma mistura com todos os reagentes foi submetida a uma desnaturação inicial por 3 minutos; seguida de 35 ciclos com desnaturação a 95°C, anelamento a 45 °C e extensão a 72°C, 1 minuto em cada temperatura.

O fragmento amplificado foi submentido à digestão por enzima de restrição; técnica de RFLP. Para tanto, uma alíquota de 10 μ L de cada produto de PCR foi digerida com 1 unidade da enzima de restrição *KpnI* (-519 A/G) (*New England Biolabs Inc.*) por 16 horas a 37°C.

4.1.5 Eletroforese

As sequências amplificadas (PCR) e digeridas (RFLP) foram analisadas por eletroforese em géis verticais de poliacrilamida a 10% a 20 mA em TBE 1x (89 mM de Tris-Borato, 89 mM de ácido bórico e 2 mM de EDTA).

O polimorfismo na posição -519 da MMP-1 é caracterizado pela substituição de uma base de adenina (A) por uma base guanina (G) resulta em dois alelos: A e

G. A enzima de restrição *KpnI* reconhece o alelo A e na presença deste o produto de PCR (200 pares de bases) é digerido em duas partes (176 e 24 pares de bases). Na eletroforese, o alelo G foi representado por uma banda de DNA de 200 pares de bases, o alelo A por uma banda de DNA de 176 pares de bases, enquanto o heterozigoto apresentou uma combinação de ambos os alelos (200 e 176 pares de bases). Durante a eletroforese, a banda com 24 pares de bases saía do gel. A visualização das bandas de DNA foi realizada em aparelho de análise de imagens Chemidoc – XRS e software Quantity One – SW (BioRad) (FIGURA 1).

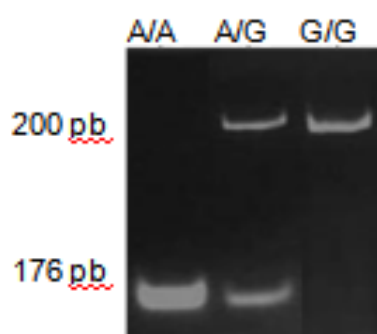


FIGURA 1: GEL RFLP DO POLIMORFISMO -519 DA MMP-1. Amostras 1, 2, 3 com padrões de banda para os genótipos do polimorfismo -519 da MMP-1.

4.1.6 Análise em haplótipo

Para a análise do haplótipo da MMP-1 (-1607 e -519) foi necessário aumentar a análise das amostras da MMP-1 -1607 realizada em estudo anterior para o pareamento dos voluntários. Para tanto foi realizada reação de PCR-RFLP de maneira semelhante ao descrito anteriormente. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram *Forward*: TCGTGAGAATGTCTTCCCATT e *Reverse*: TCTTGGATTGATTTGAGATAAGTGAAATC, a temperatura de anelamento foi de 55°C. Para RFLP utilizou-se a enzima de restrição *XmnI* a 37°C.

O polimorfismo na posição -1607 da MMP-1 é caracterizado pela inserção de uma base guanina (G), criando dois alelos diferentes (1G ou 2G). A enzima de restrição *XmnI* reconhece o alelo 1G e na presença deste o produto de PCR (118 pares de bases) é digerido em duas partes (89 e 29 pares de bases). Na eletroforese, o alelo 2G foi representado por uma banda de DNA de 118 pares de bases, o alelo 1G por uma banda de DNA de 89 pares de bases, enquanto o heterozigoto apresentou uma combinação de ambos os alelos (118 e 89 pares de bases). Durante a eletroforese, a banda com 29 pares de bases saía do gel.

4.1.7 Análise estatística

A idade dos pacientes dos grupos da amostra, considerada como variável independente, contínua e com distribuição não normal, foi analisada através do teste U de Mann Whitney, que não identificou diferença significativa entre os dois grupos estudados ($p=0,0839$); sendo a média de idade do grupo controle de 52 anos (variação de 47 a 56 anos) e do grupo teste de 53 anos (variação de 48 a 56 anos).

O índice de massa corpórea e hipertensão considerados como variável independente, categórica e com distribuição não normal, foram analisados através do teste Exato de Fisher, que não identificou diferença estatística entre os dois grupos estudados ($p=0,721$ e $p=0,749$ respectivamente).

Em relação ao questionamento sobre a presença de pé plano desde a maturidade esquelética – fim da adolescência – a resposta foi positiva em 30% dos indivíduos do grupo teste e em 32% dos indivíduos do grupo controle.

A associação entre os polimorfismos genéticos estudados e a tendinopatia primária do tendão tibial posterior foi avaliada pelo teste Qui-Quadrado, ao nível de significância de 5%. O programa ARLEQUIN (v. 2.0) foi utilizado para verificar se a população estudada estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A análise estatística da estimativa de haplótipos foi realizada utilizando o software SNPstats de livre acesso no endereço eletrônico: <http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>.

4.2 AVALIAÇÃO GENÉTICA DE PORTADORES DE CRANIOSSINOSTOSE NÃO SINDRÔMICA

4.2.1 Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa

A parte do projeto que se refere ao estudo da craniossinostose não síndrômica foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, sob o protocolo CEP-FM 081/2009 de 25 de novembro de 2009 (ANEXO 3).

4.2.2 Seleção dos pacientes

Foram estudados 13 indivíduos atendidos pelo serviço de genética do Hospital Universitário de Brasília portadores de craniossinostose não síndrômica. Os responsáveis pelos pacientes preencheram o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 4).

Para realização do microarranjo foram coletados de cada paciente 4 ml de sangue periférico em tubo contendo EDTA como anticoagulante.

4.2.3 Cariótipo – bandejamento GTG

Para a identificação cromossômica foi utilizada a técnica de bandejamento GTG descrita por SEABRIGHT (1971), com modificações. As lâminas foram tratadas com 2XSSC, pH 7,0 por 15 minutos a 60°C. Em seguida foram lavadas em água destilada e tratadas com uma solução de tripsina (1:250) (Difco Laboratories, Sparks, EUA) em tampão fosfato Sörensen, pH 6,8, a 37°C por 10 segundos a um minuto, dependendo da idade da lâmina. A seguir as lâminas foram lavadas em água destilada e coradas por 2 a 3 minutos com uma solução a 2% do corante de Giemsa (Merck, Darmstadt, Alemanha), em tampão fosfato Sörensen, pH 6,8. As lâminas foram lavadas em água destilada e secas ao ar. A análise do cariótipo foi realizada pela equipe de médicos geneticistas do Hospital Universitário de Brasília.

4.2.4 Busca de alterações cromossômicas submicroscópicas por CGH Array

O exame de cariótipo, historicamente realizado para a triagem de alterações cromossômicas, possui resolução de até 4-10 Mb. Assim, para a detecção de alterações cromossômicas menores são necessárias técnicas com maior poder de resolução.

A técnica de *CGH-array* (arranjo de DNA por hibridação genômica comparativa) permite analisar microdeleções ou microduplicações, simultaneamente, em milhares de sequências alvo do genoma. Esta técnica utiliza como alvo de hibridação um conjunto de sondas (oligonucleotídeos), com localização previamente conhecida nos cromossomos, organizados em alta densidade em um chip (*GeneChip*®) de DNA (HASTINGS *et al.*, 2009; WAIN *et al.*, 2009). A investigação da presença de alterações cromossômicas submicroscópicas por *CGH-array* em pacientes com craniossinostose não síndrômica foi feita utilizando a plataforma *CytoScan*® 750K Array (*Affymetrix*, EUA) e as configurações disponíveis no *GeneChip*® Scanner 3000 7G System (*Affymetrix*, EUA). Essa plataforma utiliza

microarranjos de DNA contendo 550.000 sondas não polimórficas para variante de número de cópias (CNVs) de regiões codificantes e não codificantes do genoma humano, cobrindo uma distância média de 1 Kb, e cerca de 200.000 SNPs. O sistema todo inclui os oligonucleotídeos pré-arranjados em *GeneChip*[®], conjunto de 38 reagentes diferentes, equipamentos para hibridização, lavagem, coloração, leitura e visualização dos microarranjos, e programa computacional necessário para a identificação dos SNPs e das CNVs.

4.2.5 Preparação do DNA genômico

Seguindo os padrões recomendados pelo fabricante quanto à estrutura de trabalho, condições e materiais utilizados foi dada sequência ao protocolo do CGH-*array* para a análise das amostras, que tem início com a normalização das amostras para a concentração final de 50 ng/μL de DNA diluído em *Low EDTA TE buffer* (*Affymetrix*, EUA). Utilizou-se o protocolo estabelecido para grupo de 8 reações contando com 6 amostras, um controle positivo e um controle negativo, fornecidos pelo kit utilizado no procedimento.

4.2.6 Digestão com *Nsp* I, ligação de adaptadores e amplificação por PCR

Os DNAs dos pacientes e controles foram submetidos à digestão em sítios específicos com a enzima *Nsp* I (*Affymetrix*, EUA) para a obtenção de fragmentos de DNA de tamanhos variados e posterior ligação de adaptadores com a T4 DNA *Ligase* (*Affymetrix*, EUA), preparando a amostra para a amplificação através da reação da PCR.

Foi utilizada uma mistura de 5 μL de DNA (50ng/μL), 11,55 μL de água (*Chilled Affymetrix® Nuclease-Free Water*), 2,00 μL de tampão da *Nsp* I (10X), 0,20 μL de albumina bovina sérica (BSA) (100X) e 1,0μl da enzima *Nsp* I (10 U/μL). A seguir, a mistura foi colocada no termociclador *MyCycler*[®] (*Bio-Rad*, EUA) por duas horas a 37°C e 20 minutos a 65°C. Os produtos da digestão foram armazenados a -20°C.

A seguir, foi realizada a ligação dos fragmentos de DNA a adaptadores específicos, com a mistura de 0,75 μL de adaptador *Nsp* I (50 μM), 2,50 μL de tampão da T4 DNA *Ligase* (10X) e 2,00 μL da enzima T4 DNA *Ligase* (400 U/μL). A mistura foi colocada em termociclador (*Bio-Rad*, EUA) por três horas a 16°C e 20

minutos a 70°C. Os produtos da reação de ligação foram diluídos com 75µL de água e foram armazenados a -20°C até o próximo passo.

Foram feitas quadruplicatas das reações da PCR de cada amostra para aumentar a quantidade do DNA genômico. Os fragmentos de DNA ligados a adaptadores *Nsp* I foram submetidos à reação da PCR com a utilização de 39,5µL de água, 10,0 µL de tampão da TITANIUM™ *Taq* (10X), 20,0 µL de reagente GC-*Melt*, 14,0 µL de mistura de dNTP's (2,5mM cada), 4,5µL do iniciador PCR Primer 002 (100µM) (*Clontech*, EUA) e 2,0 µL da enzima TITANIUM™ *Taq* DNA polimerase (50X) (*Clontech*, EUA). Foram colocadas em um termociclador Veriti™ onde as reações tinham 1 ciclo de incubação a 94°C (3 minutos), 30 ciclos de 94°C (30 segundos), 60°C (45 segundos) e 68°C (15 segundos) e um último ciclo de 68°C (7 minutos).

O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. O tamanho dos fragmentos deve ser de cerca de 150 a 2000 pares de bases (pb), confirmando o sucesso da digestão, ligação e PCR, permitindo a sequência do protocolo (FIGURA 2). Os produtos das PCRs foram armazenados a -20°C até o próximo passo.

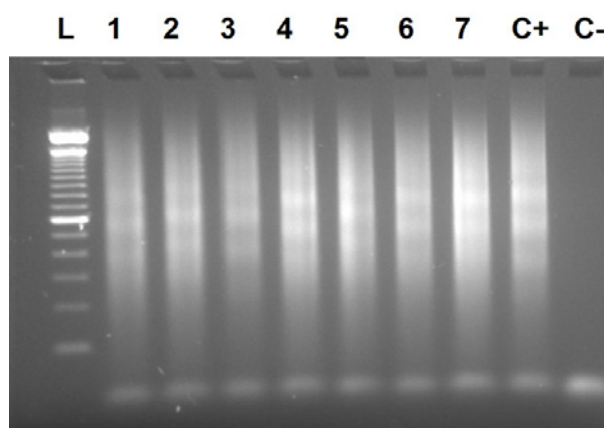


FIGURA 2: PCR APÓS DIGESTÃO COM *NSP* 1. Na primeira coluna (L) *DNA Ladder* de 50 a 2000pb. Da segunda para a oitava coluna, amostras dos pacientes analisados. C+ e C- se referem aos controles positivo e negativo da reação.

4.2.7 Mistura dos produtos de PCR, purificação e quantificação.

Os produtos das PCRs das quadruplicatas de cada amostra foram reunidos em um único tubo (volume final 397 µL) e os fragmentos de DNA foram capturados com o uso de esferas magnéticas (*Affymetrix*, EUA). Após incubação e

centrifugação, as esferas magnéticas contendo fragmentos de DNA aderidos a sua superfície foram selecionadas por força magnética na *MagnaRack*TM (Life Technologies, EUA), lavadas com tampão da purificação (*Affymetrix*, EUA) e, finalmente, os DNAs eluídos em tampão de eluição (*Affymetrix*, EUA) para um volume final de 47 μ L. O material foi quantificado no espectrofotômetro *NanoVue Plus*. Para continuação do protocolo, cada amostra deve apresentar valores de concentração de DNA ≥ 3.0 μ g/ μ L. Os produtos das PCRs purificados foram armazenados a -20°C até o próximo passo.

4.2.8 Fragmentação dos produtos das PCRs

Os produtos das PCRs inicialmente foram misturados com 10 μ L do mix de fragmentação que é cuidadosamente preparado com 123.5 μ L de água, 158,4 μ L de tampão de fragmentação 10x (*Affymetrix*, EUA) e 5,8 μ L do reagente de fragmentação (2,5 U/ μ L). A mistura foi colocada no termociclador VeritiTM por 35 minutos a 37°C e 15 minutos a 95°C. A fragmentação (volume final: 55 μ L) foi observada pela presença de fragmentos entre 25 e 125 pb em eletroforese em gel de agarose 4% corado com brometo de etídio (FIGURA 9). Os fragmentos obtidos foram armazenados a -20°C até o próximo passo.

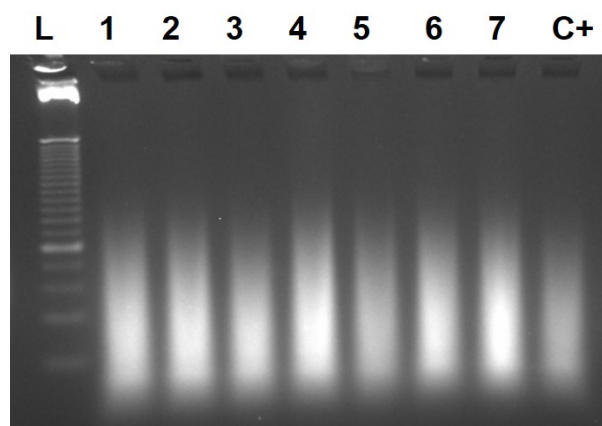


FIGURA 9: FRAGMENTAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR. Na primeira coluna (L) *DNA Ladder* de 50 a 2000pB. Da segunda para a sétima coluna, amostras dos pacientes analisados. C+ se refere ao controle positivo da reação. O rastro intenso baixo de DNA representa o sucesso da reação de fragmentação.

4.2.9 Marcação do DNA fragmentado com biotina

A marcação das amostras foi realizada com a mistura de 51 μ L do DNA fragmentado e 19,5 μ L da mistura de marcação formada por 14,0 μ L de tampão *Terminal deoxynucleotidyl Transferase* (5X), 2,0 μ L de reagente de marcação de

DNA 30mM (biotina) e 3,5µL da enzima *TdT* (30 U/µl). A mistura foi colocada em um termociclador Veriti™ por quatro horas a 37°C e 15 minutos a 95°C. O DNA marcado com biotina foi armazenado a -20°C até o próximo passo.

4.2.10 Hibridização

Primeiramente foi preparada a mistura de hibridização com os tampões de hibridização parte 1 (165,0 µL), parte 2 (15,0 µL), parte 3 (7,0 µL) e parte 4 (1,0 µL), mais 2,0 µL de OCR (*Oligo Control Reagent*, Affymetrix, EUA). Em seguida foi realizada a mistura de 70,5 µL de DNA biotinilado e 190 µL da mistura de hibridização. Esta mistura foi aquecida no termociclador Veriti™ a 95°C por 10 minutos e resfriada a 49°C até o próximo passo. Ainda no termociclador, 200µl da mistura desnaturada foi depositada imediatamente em cada um dos *GeneChip*® com os oligonucleotídeos pré-arranjados. Os *GeneChip*® com o DNA são incubados em forno de hibridização (modelo *Hybridization Oven* 645, Affymetrix, EUA) a 50°C durante 16 a 18 horas a 60 rpm.

4.2.11 Lavagens dos *GeneChip*® e marcação com fluoróforos

A lavagem e marcação dos *GeneChip*® foi realizada, quatro por vez, na estação automatizada Fluidics Station 450 (Affymetrix, EUA) que foi previamente abastecida com os tampões de lavagem A e lavagem B (Affymetrix, EUA) mais água deionizada. Foram preparados também os tubos separados contendo os tampões de marcação 1 (500 µL), 2 (500 µL) e 800 µL de holding buffer (Affymetrix, EUA) que apresentam em suas formulações os elementos essenciais (estreptavidina, ficoeritrina - SAPE e anticorpo biotinilado antiestreptavidina) para a formação da fluorescência durante a leitura dos *GeneChip*® com o laser. Em seguida, os *GeneChip*® são retirados do forno de hibridização e, imediatamente, colocados (quatro por vez) na estação fluídica onde as sequências de lavagens e marcações dos microarranjos contidos nos chips por fluoróforos são automatizadas sob controle do software Affymetrix *GeneChip*® Command Console™ (AGCC) versão 3.2.2 (Affymetrix, EUA).

4.2.12 Escaneamento dos *GeneChip*®, captação de imagens e análise no software *Chromosome Analysis Suite* 1.2.2 (Affymetrix®)

Os chips com microarranjos foram colocados no *GeneChip® Scanner 3000 7G* (Affymetrix, EUA), gerenciado pelo programa AGCC. As imagens geradas pela excitação dos fluoróforos (ficoeritrina) captadas pelo digitalizador foram submetidas primeiramente à análise de controle de qualidade geral (QC) por meio do programa *Genotyping Console* versão 3.2.2 (Affymetrix, EUA). A imagem dessa leitura pode ser observada com o programa de visualização *Affymetrix GeneChip Viewer* (Affymetrix, EUA), onde também se podem verificar os controles positivos do sistema de forma a se comprovar que as condições de hibridização do microarranjo foram adequadas.

Após estes procedimentos, utilizando o software *Chromosome Analysis Suite* (ChAS) versão 1.2.2 (Affymetrix, EUA) é possível visualizar e analisar as alterações cromossômicas (duplicações, deleções, CNVs, mosaicismo, perda de heterozigosidade) ao longo do genoma de cada amostra. O programa é oferecido gratuitamente no sítio do fabricante (www.affymetrix.com) e trabalha com a interface do *Windows 7*. Ele permite analisar arquivos no formato *.CEL* gerados pelo software de leitura (*Affymetrix CytoScan® Arrays*) dos *GeneChip®*, visualizar os dados resultantes da análise da hibridização (arquivos *CYCHP*) sumarizados em forma de tabelas e gráficos, visualizar os dados (arquivos *CNCHP*) da plataforma (*CytoScan™ HD Array*) com a qual são comparados os dados das amostras. O *software* permite, ainda, criar e customizar parâmetros e regiões para uma análise específica, aplicar filtros para todo o genoma ou regiões de interesse específico para remover informações não relevantes, realizar análises comparativas entre diferentes amostras, além de acessar os principais bancos de dados externos (*NCBI*, *UCSC Genome Browser*, *Ensembl*, *OMIM®*). Como todo este conjunto de ferramentas da bioinformática disponíveis, a habilidade do pesquisador é que vai permitir buscar e compreender as alterações de relevância clínica dentre a grande quantidade de dados, normalmente, gerados pelo *array*.

5 CAPITULO I

“MMP-1 promoter genotype and haplotype association with posterior tibial tendinopathy”



MMP-1 promoter genotype and haplotype association with posterior tibial tendinopathy

José Eduardo Baroneza^a, Alexandre Godoy-Santos^b, Bruno Ferreira Massa^b,
Francielle Boçon de Araujo Munhoz^a, Túlio Diniz Fernandes^b, Maria Cristina Leme Godoy dos Santos^{a,*}

^a Department of Cell Biology, University Federal of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

^b Department of Orthopedics and Traumatology, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 March 2014

Received in revised form 16 June 2014

Accepted 1 July 2014

Available online 1 July 2014

Keywords:

Tibial posterior tendon

Tendinopathy

Risk factor

MMP-1 polymorphism

ABSTRACT

Purpose: Posterior tibial tendon (PTT) is particularly vulnerable and its insufficiency is recognized as the main cause of adult acquired flatfoot. Some patients have a predisposition without clinically recognized cause, suggesting that individual characteristics play an important role in tendinopathy. The objective of the present study is to investigate the association of –519 (rs1144393) matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) polymorphism and the –1607 (rs1799750) and –519 MMP-1 haplotypes and risk of PTT dysfunction.

Methods: The test group included 50 females who presented PTT dysfunction Grade 2 or 3, and who were submitted to surgical treatment, with histopathological examination of the tendon and magnetic resonance image (MRI) confirming tendinopathy, while the control group was 100 asymptomatic women who present intact PTT at MRI. We analyzed functional polymorphisms MMP-1 and their haplotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length analysis.

Results: There was a significant difference in the presence of the different alleles and genotypes between the control group and test group for the MMP-1 gene ($p \leq 0.01$). The G allele of the –519 MMP-1 polymorphism increased susceptibility to degeneration in the PTT tendon and seems to be a genetic risk factor. Global haplotype analysis indicated a significant difference between both groups ($p < 0.0001$). Haplotypes G–2G and A–2G had statistically significant risk effect on PTT insufficiency. G–2G, $p < 0.001$; OR = 5.72 (CI, 2.84–11.52) and A–2G $p = 0.002$, OR = 3.95 (CI, 1.65–9.44).

Conclusion: According to our results, –519 MMP-1 isolated and –1607/–519 MMP-1 haplotypes are associated to tendinopathy in posterior tibial tendon.

© 2014 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

The mechanisms of tendinopathy are complex, and involve mechanical stress, degenerative changes in the tendon tissue and disorganized healing, along with a contribution from inflammatory processes (Fredberg and Stengaard-Pedersen, 2008; Sharma and Maffulli, 2006).

Posterior tibial tendon (PTT) dysfunction is recognized as an etiology leading to acquired flatfoot in adults (Pomeroy et al., 1999). It is three times more often in females, the peak incidence happening at the age of 55 and it is more common in Caucasian, obese, diabetic, rheumatic and hypertensive patients (Deland et al., 2005). Several risk factors, like impingement at fibrous-osseous groove, insertion abnormalities, hypovascularity area within the tendon and congenital flatfoot, have

been proposed in literature (Dyal et al., 1997; Frey et al., 1990; Funk et al., 1986; Holmes and Mann, 1992; Johnson, 1983; Kettelkamp and Alexander, 1969; Mann, 1982). However, many patients present PTT dysfunction without any of these risk factors and systemic conditions.

The question arises why some individuals are more susceptible to developing tendinopathy compared to others who have a similar level of physical activity and clinical conditions. Nevertheless, it is possible that an interaction among the various extrinsic and intrinsic factors – genetic include – increases the likelihood of the patient developing tendinopathy.

Gene polymorphisms are a mechanism by which individuals may exhibit variations within the range of what is considered biologically normal (Thompson et al., 1991). Some authors already prove the influence of genetic polymorphisms in tendinopathy (Mokone et al., 2005, 2006; Posthumus et al., 2009a,b; Raleigh et al., 2009; September et al., 2009), inclusive in PTT dysfunction (Godoy-Santos et al., 2013, 2014).

Some studies have shown that normal PTT has, in its extracellular matrix, 95% of collagen type I and small amounts of collagen types III, IV and V (Neville and Houck, 2009; Satomi et al., 2008). These

Abbreviations: PTT, posterior tibial tendon; MMPs, matrix metalloproteinases.

* Corresponding author at: University Federal of Paraná, Centro Politécnico, Rua Francisco H. dos Santos, Jd. das Américas, 81531-990 Curitiba, PR, Brazil.

E-mail address: lemegsantos@gmail.com (M.C. Leme Godoy dos Santos).

components confer parallel bundles on the tendon structure and allow elastic and mechanical resistance to PTT. According to biochemical studies, posterior tibial tendinopathy has shown, in its extracellular matrix, an increase of 53.6% in collagen type III and 26.4% of collagen type V, both molecules responsible for the elasticity of the tendon tissue, and a decrease of 40.4% in the α -1 chain and 42.5% in the α -2 chain of collagen type I, component responsible for building thick fibers that give resistance to the tendon tissue.

The authors have concluded that this different biochemical pattern found in the posterior tibial tendinopathy is a possible explanation to decrease the resistance and the elasticity of the tendon tissue, leading to PTT dysfunction (Goncalves-Neto et al., 2002; Silver et al., 2003).

Matrix metalloproteinases (MMPs) represent the major class of enzymes responsible for the degradation and removal of collagen and could have an important role in tendinopathy process. MMP-1 is a major proteinase of the MMP family that specifically degrades collagen types I and III, which are resistant to most proteinases (Visse and Nagase, 2003). Normally, the expression of MMP-1 is low but it is readily induced by phorbol esters, growth factors, and inflammatory cytokines. Its expression can also be induced in response to local conditions such as the mechanical load or inflammatory processes (Kerrigan et al., 2000).

The MMP-1 gene is located on chromosome 11q22. The polymorphism at position –519 is characterized by the substitution of a base adenine (A) for guanine (G) (A-519G) and displayed poor cellular differentiation (Dey et al., 2014). Up to date, –519 A/G was associated with hypertension and mean internal carotid artery, intima media thickness (Armstrong et al., 2007) and was indicated as a risk factor for coronary artery disease. The association of the –519 and –340 MMP-1 haplotypes with myocardial infarction was reported among British, Swedish and Chinese populations (Han et al., 2009; Pearce et al., 2005). Case-control study conducted on Spanish population revealed protective effect of this haplotype on myocardial infarction (Román-García et al., 2009). This haplotype had also protective effect on carotid plaque presence (Djurić et al., 2012). The –519 and –1607 MMP-1 haplotypes had higher risk implant loss (Leite et al., 2008). Three polymorphisms in MMP-1 (–1607, –519 and –340) in combination can have a protective effect in bicuspid aortic valve patients (Martín et al., 2013). The –519 MMP-1 and –1171 MMP-3 haplotypes were shown to have a genetic risk factor for acute coronary syndrome (Xu et al., 2013). We showed that –1607 MMP-1 polymorphism solely is associated with tendinopathy primary posterior tibial (Godoy-Santos et al., 2013).

The purpose of the present study has been to investigate the association of –519 (rs1144393) MMP-1 polymorphism and –519 and –1607 (rs1799750) haplotypes with PTT insufficiency.

2. Methods

The present study followed the guidelines of the Declaration of Helsinki. We have recruited a sample of 150 participants from the patient pool at the Foot and Ankle Group, Department of Orthopedics and Traumatology of University of São Paulo. After an explanation of the work, as recommended by the Research Ethics Committee, written consent was obtained from each participant.

This is a case-control cross-sectional study; being its protocol approved by the institutional ethics committee under number 708 and the committee of researching projects of the university under number 0901/09.

The patients were identified according to age, gender, body mass index (BMI), hypertension, medical history, medication use, personal history of systemic diseases, and infectious and inflammatory diseases. All volunteers were female, since posterior tibial tendon dysfunction is three times more often in females, the peak incidence happening at

the age of 55. Participants were divided into two groups, similarly matched for age:

- Test group – 50 females who presented PTT dysfunction and
- Control group – 100 asymptomatic females who presented intact PTT.

The inclusion and exclusion criteria were determined as shown below.

Inclusion criteria for the test group were:

1. PTT dysfunction diagnosed
2. Grade II or III (Johnson & Strom Classification System)
3. Submitted to surgical treatment
4. Tendinopathy confirmed by histopathology (myxoid degeneration associated with multifocal vascular proliferation) and MRI (T2 image showing intermediate signal intensity and tendon thickening)
5. Female

Inclusion criteria for the test group were:

1. Asymptomatic individuals in the topography of PTT
2. Individuals who show no signal changes on MRI
3. Female

Exclusion criteria for both groups:

1. Obesity greater than Grade 1
2. Diabetes
3. Rheumatic diseases
4. Immunological disorders
5. Liver or kidney disease
6. Infection or trauma in the topography of the foot and ankle
7. Male

2.1. Sampling and DNA extraction

DNA from epithelial buccal cells was extracted using the procedure described by Aidar and Line (2007). The DNA was estimated by measurements of optical density 260/280.

2.2. Polymerase chain reaction (PCR) and restriction endonuclease digestion (RFLP)

The MMP-1 genotype was determined using the PCR-RFLP assay. The PCR primers used for amplifying the MMP-1 polymorphism were: to –519A/G polymorphism forward primer 5'-CATGGTGCTATCGCAATAGGGT-3' and reverse primer 5'-TGCTACAGGTTTCTCCACAC-3' and to –1612G/GG polymorphism forward primer 5'-TCGTGAGAATGTCTCCCAT-3' and reverse primer 5'-TCTTGGATTGATTGAGATAAGTGAATC-3'.

PCR primers were carried out in a total volume of 15 μ l containing 400 ng genomic DNA, 8 μ l *Taq Green* (Amersham Pharmacia-Biotech, Uppsala, Sweden) and 200 nmol of each primer. A 10 μ l aliquot of PCR products was then digested with 1 unit of *KpnI* (–519A/G) or *XmnI* (–1612G/GG) enzyme at 37 °C overnight.

2.3. Gel electrophoresis

The total amount of aliquot of the digest was electrophoresed on a 10% vertical non-denaturing polyacrylamide gel at 20 mA. The gel was stained by ethidium bromide.

The polymorphism at position –519 is characterized by the substitution of a base adenine (A) for guanine (G) results in two alleles: A and G. The G allele represented by the DNA of 200 base pairs and the A allele represented by the DNA of 176 base pairs. The heterozygous has a combination of both alleles.

The polymorphism at position –1607 is characterized by the insertion/deletion of a base guanine (G) results in two alleles: 1G and 2G. The allele 2G represented by the DNA of 118 base pairs and the allele 1G represented by the DNA of 89 base pairs. The heterozygous has a combination of both alleles.

2.4. Statistical analysis

We used the Mann–Whitney U test to determine any significant differences between ages of both groups and the Fisher's exact test for analyzing the BMI and hypertension of both groups.

We used the Chi-square test for analyzing the frequencies of alleles and genotypes of the promoter gene of MMP-1 in both groups; p value < 0.05 being considered statistically significant.

The program ARLEQUIN (v. 2.0 – Schneider et al., 2000) was used to verify the Hardy–Weinberg equilibrium in the studied sample.

Statistical analysis of the haplotype estimation and linkage disequilibrium was conducted using the SNPStats software (<http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>).

2.5. Sample analysis

The target population was females in their fifth or sixth decade of life. We obtained the sample at convenience.

The analysis of the age of both groups resulted in p value = 0.0839. The control group showed mean age of 52 years (47–56) and the test group of 53 years (48–56).

The analysis of BMI and hypertension of both groups resulted in p value = 0.721 and p value = 0.749, respectively. They showed no significant difference.

Regarding questions about the presence of flatfoot dating from the skeletal maturity – in late teenage, the response was 30% positive at the test group and 32% at the control group.

3. Results

All genotype distributions in the study participants were in Hardy–Weinberg equilibrium.

There was a significant difference in the presence of alleles and genotype between the control group and the test group for the MMP-1 gene (Table 1). The G allele was found in 62% of the test group, while in 56% of patients of the control group observed the A allele ($p = 0.010$). In the test group, the G/G genotype was observed with a frequency of 46%, while in the control group 48% were heterozygosis ($p < 0.001$).

In another study (Godoy-Santos et al., 2013) we showed that the –1607 polymorphism in MMP-1 gene also was associated with tendinopathy in PTT in the same population ($p < 0.001$).

We found moderate linkage disequilibrium between –1607 and –519 MMP-1 polymorphisms ($D' = 0.24$).

In haplotype analysis of –519A/G and –1612G/G polymorphism, the A–G haplotype was set as a referent and more frequent in controls. Compared to it, G–2G and A–2G had statistically significant risk effect on

PTT insufficiency: G–2G, $p < 0.001$; OR = 5.72 (CI, 2.84–11.52) and A–2G $p = 0.002$, OR = 3.95 (CI, 1.65–9.44). Global haplotype analysis indicated a significant difference between both groups ($p < 0.0001$) (Table 2).

4. Discussion

Although MMPs are important for the degradation and remodeling of the tendon, there are only limited data suggesting the association of MMP polymorphism with tendinopathy (Godoy-Santos et al., 2013, 2014; Magra and Maffulli, 2008; Malila et al., 2011; Raleigh et al., 2009; September et al., 2007).

In the first analysis of the genetic influence in the posterior tibial tendinopathy, we concluded that C–799T polymorphism in MMP-8 is associated with a PTT dysfunction. Our results indicate that individuals with the T allele are at greater risk of developing a tendinopathy (Godoy-Santos et al., 2014).

In another study (Godoy-Santos et al., 2013), we observed that the –1607 MMP-1 polymorphism also is associated with posterior tibial tendinopathy. The allele 2G increases the transcriptional activity of the gene and provides the molecular basis for a more intense degradation of collagen.

Here on this case–control cross-sectional study, we identified the strongest association of –519 MMP-1 polymorphism and PTT insufficiency. The A allele was observed in the most part of the control group; while the G allele was more frequent in the test group. The A allele may indicate an protective effect to injury in the PTT.

The haplotype analysis of –519 and –1612 polymorphism together showed the significantly increased risk for PTT insufficiency in haplotypes G–2G and A–2G compared to referent haplotype A–G. However, the results must be taken with caution concerning the number of investigated patients.

Genetic polymorphisms probably influence the tendinopathy process through the accumulated effect of multiple polymorphisms. Haplotypes do have a higher probability than individual polymorphisms showing linkage disequilibrium with an unknown causal variant, especially the rare ones (<5%). Synergistic action of different polymorphisms increases the risk of the degeneration of the PTT. The analysis of haplotype frequencies and results of imbalances among different polymorphisms seems to be of great value for understanding the pathophysiology of the posterior tibial tendinopathy.

Studies have demonstrated a disproportion of several types of collagen in tendinopathy; specifically PTT dysfunction is increased in type III, IV or V collagen and decreased in type I collagen that is diffusely distributed, and grossly surrounded by type III fibrils (Satomi et al., 2008). MMP-1 cleaves all subtypes of collagen, especially the triple helix fibrillar collagen types I and III (Birkedal-Hansen et al., 1993; Vincenti, 2001). Thus, MMP-1 polymorphisms associated with tendinopathy PTT can alter collagens I and III of this tendon and may explain a higher risk in this patient. We showed that two polymorphisms in MMP-1 isolated and haplotypes are associated to PTT insufficiency; however replication studies in other populations as well as functional studies are needed to clarify complex role of MMP-1 in tendinopathy.

The determination of genetic pattern in patients with tendinopathy would enable the early identification of individuals at higher risk to develop this disease. Thus, genetic markers will be identified, contributing to appropriate strategies for prevention and treatment.

5. Conclusion

In conclusion our results suggest that haplotypes in –519 and –1607 MMP-1 polymorphisms are associated with the posterior tibial tendinopathy. Haplotypes G–2G and A–2G had statistically significant risk effect on PTT insufficiency.

Table 1
Distribution of the –519 MMP-1 polymorphism allele and genotype in the control and test groups.

MMP-1	Control group	Test group	p value	OR (95%CI) ^a
–519 allele	n = 200	n = 100	(Chi-squared)	
A	56 (112)	38 (38)	p = 0.010	
G	44 (88)	62 (62)		0.48 (0.29–0.78)
–519 genotype	n = 100	n = 50	(Chi-squared)	
A/A	32 (32)	22 (11)		1
A/G	48 (48)	32 (16)	p < 0.001	0.97 (0.40–2.36)
G/G	20 (20)	46 (23)		3.35 (1.35–8.31)

The values are expressed as percentage with the number of subjects (n) in parentheses.

^a OR: odds ratio and CI: confidence interval.

Table 2
Frequency distribution of haplotypes for –519A/G and –1607G/GG MMP-1 polymorphisms in the control and test groups.

Haplotype –519/–1607	Frequency total	Frequency control	Frequency test	p-Value	OR* (95%CI)
A–G	0.338	0.436	0.136	–	1.00
G–GG	0.265	0.126	0.537	<0.001	5.72 (2.84–11.52)
G–G	0.235	0.314	0.084	0.97	0.98 (0.33–2.86)
A–GG	0.161	0.124	0.244	0.002	3.95 (1.65–9.44)

OR: odds ratio, CI: confidence interval, and global haplotype association.

* p = 0.0001.

Conflict of interest

The authors do not have any conflict of interests.

Acknowledgments



This work was supported by CNPq grant 40001016007P8 and Center of Studies Godoy Moreira (71740039/001-93).

References


- Aidar, M., Line, S.R., 2007. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz. Dent. J.* 18, 148–152.
- Armstrong, C., Abilleira, S., Sitzer, M., Markus, H.S., Bevan, S., 2007. Polymorphisms in MMP family and TIMP genes and carotid artery intima-media thickness. *Stroke* 38 (11), 2895–2899.
- Birkedal-Hansen, H., Moore, W.G., Boddien, M.K., Windsor, L.J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A., Engler, J.A., 1993. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4, 197–250.
- Deland, J.T., De Asla, R.J., Sung, I.H., Emberg, L.A., Potter, H.G., 2005. Posterior tibial tendon insufficiency: which ligaments are involved? *Foot Ankle Int.* 26, 427–435.
- Dey, S., Ghosh, N., Saha, D., Kesh, K., Gupta, A., Swarnakar, S., 2014. Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) promoter polymorphisms are well linked with lower stomach tumor formation in eastern Indian population. *PLoS One* 9 (2), e88040.
- Djurić, T., Stojković, L., Zivković, M., Končar, I., Stanković, A., Djordjević, A., Alavantić, D., 2012. Matrix metalloproteinase-1 promoter genotypes and haplotypes are associated with carotid plaque presence. *Clin. Biochem.* 45 (16–17), 1353–1356.
- Dyal, C., Feder, J., Deland, J.T., Thompson, F.M., 1997. Pes planus in patients with posterior tibial tendon insufficiency: asymptomatic versus symptomatic foot. *Foot Ankle Int.* 18, 85–88.
- Fredberg, U., Stengaard-Pedersen, K., 2008. Chronic tendinopathy tissue pathology, pain mechanisms, and etiology with a special focus on inflammation. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 18, 3–15.
- Frey, C., Shereff, M., Greenidge, N., 1990. Vascularity of the posterior tibial tendon. *J. Bone Joint Surg.* 72-A, 884–888.
- Funk, D., Cass, J.R., Johnson, K.A., 1986. Acquired adult flat foot secondary to posterior tibial-tendon pathology. *J. Bone Joint Surg.* 68-A, 95–102.
- Godoy-Santos, A., Cunha, M.V., Ortiz, R.T., Diniz Fernandes, T., Mattar Jr., R., dos Santos, M. C., 2013. MMP-1 promoter polymorphism is associated with primary tendinopathy of the posterior tibial tendon. *J. Orthop. Res.* 31 (7), 1103–1107.
- Godoy-Santos, A., Ortiz, R.T., Mattar-Junior, R., Diniz Fernandes, T., Leme Godoy dos Santos, M.C., 2014. MMP-8 polymorphism is genetic marker to tendinopathy primary posterior tibial tendon. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 24 (1), 220–223.
- Goncalves-Neto, J., Witzel, S.S., Teodoro, W.R., Carvalho-Júnior, A.E., Diniz Fernandes, T., Yoshinari, H.H., 2002. Changes in collagen matrix composition in human posterior tibial tendon dysfunction. *Joint Bone Spine* 69, 189–194.
- Han, Y.J., Kim, H.N., Yoon, J.K., Yi, S.Y., Moon, H.S., Ahn, J.J., Kim, H.L., Chung, H.W., 2009. Haplotype analysis of the matrix metalloproteinase-9 gene associated with advanced-stage endometriosis. *Fertil. Steril.* 91 (6), 2324–2330.
- Holmes Jr., G.B., Mann, R.A., 1992. Possible etiologic factors associated with rupture of the posterior tibial tendon. *Foot Ankle* 13, 70–79.
- Johnson, K.A., 1983. Tibialis posterior tendon rupture. *Clin. Orthop.* 177, 140–147.
- Kerrigan, J.J., Mansell, J.P., Sandy, J.R., 2000. Matrix turnover. *J. Orthod.* 27, 227–233.
- Kettelkamp, D.B., Alexander, H.H., 1969. Spontaneous rupture of the posterior tibial tendon. *J. Bone Joint Surg.* 51-A, 759–764.
- Leite, M.F., Santos, M.C., de Souza, A.P., Line, S.R., 2008. Osseointegrated implant failure associated with MMP-1 promoter polymorphisms (–1607 and –519). *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 23 (4), 653–658.
- Magra, M., Maffulli, N., 2008. Genetic aspects of tendinopathy. *J. Sci. Med. Sport* 11, 243–247.
- Malila, S., Yuktanandana, P., Saowaprut, S., Jiamjarasrangi, W., Honsawek, S., 2011. Association between matrix metalloproteinase-3 polymorphism and anterior cruciate ligament ruptures. *Genet. Mol. Res.* 10 (4), 4158–4165.
- Mann, R.A., 1982. Rupture of the tibialis posterior tendon. *American Academy of Orthopaedics Surgeons. Instructional Course Lectures*, vol. 33. C. V. Mosby, St Louis, pp. 302–309.
- Martín, M., Pichel, I.A., Flórez Muñoz, J.P., Naves-Díaz, M., Palacín, M., Cannata-Andía, J.B., Morís, C., Rodríguez, I., 2013. Low transcriptional activity haplotype of matrix metalloproteinase 1 is less frequent in bicuspid aortic valve patients. *Gene* 524 (2), 304–308.
- Mokone, G.G., Gajjar, M., September, A.V., Schwelnlus, M.P., Greenberg, J., Noakes, T.D., Collins, M., 2005. The guanine–thymine dinucleotide repeat polymorphism within the tenascin-C gene is associated with Achilles tendon injuries. *Am. J. Sports Med.* 33, 1016–1021.
- Mokone, G.G., Schwelnlus, M.P., Noakes, T.D., Collins, M., 2006. The COL5A1 gene and Achilles tendon pathology. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 16, 19–26.
- Neville, C.G., Houck, J.R., 2009. Choosing among 3 ankle-foot orthoses for a patient with stage II posterior tibial tendon dysfunction. *J. Orthop. Sports Phys. Ther.* 39, 816–824.
- Pearce, E., Tregouet, D.A., Samnegård, A., Morgan, A.R., Cox, C., Hamsten, A., Eriksson, P., Ye, S., 2005. Haplotype effect of the matrix metalloproteinase-1 gene on risk of myocardial infarction. *Circ. Res.* 97 (10), 1070–1076.
- Pomeroy, G.C., Maine, S.P., Pike, R.H., Manoli II, A., 1999. Current concepts review – acquired flatfoot in adults due to dysfunction of the posterior tibial tendon. *J. Bone Joint Surg. Am.* 81-A, 1173–1182.
- Posthumus, M., September, A.V., Keegan, M., O’Cuinnneagáin, D., Van der Merwe, W., Schwelnlus, M.P., Collins, M., 2009a. Genetic risk factors for anterior cruciate ligament ruptures: COL1A1 gene variant. *Br. J. Sports Med.* 43, 352–356.
- Posthumus, M., September, A.V., Schwelnlus, M.P., Collins, M., 2009b. Investigation of the Sp1-binding site polymorphism within the COL1A1 gene in participants with Achilles tendon injuries and controls. *J. Sci. Med. Sport* 12, 184–189.
- Raleigh, S.M., van der Merwe, L., Ribbans, W.J., Smith, R.K., Schwelnlus, M.P., Collins, M., 2009. Variants within the MMP3 gene are associated with Achilles tendinopathy: possible interaction with the COL5A1 gene. *Br. J. Sports Med.* 43, 514–520.
- Román-García, P., Coto, E., Reguero, J.R., Cannata-Andía, J.B., Lozano, I., Avanzas, P., Morís, C., Rodríguez, I., 2009. Matrix metalloproteinase 1 promoter polymorphisms and risk of myocardial infarction: a case-control study in a Spanish population. *Coron. Artery Dis.* 20 (6), 383–386.
- Satomi, E., Teodoro, W.R., Parrac, E.R., Diniz Fernandes, T., Velosa, A.P., Capelozzi, V.L., Yoshinari, N.H., 2008. Changes in histoanatomical distribution of types I, III and V collagen. *Clinics* 63 (1), 9–14.
- September, A.V., Cook, J., Handley, C.J., van der Merwe, L., Schwelnlus, M.P., Collins, M., 2009. Variants within the COL5A1 gene are associated with Achilles tendinopathy in two populations. *Br. J. Sports Med.* 43 (5), 357–365.
- September, A.V., Schwelnlus, M.P., Collins, M., 2007. Tendon and ligament injuries: the genetic component. *Br. J. Sports Med.* 41, 241–246.
- Schneider, S., Roessli, D., Excoffier, L., 2000. ARLEQUIN ver. 2000: a software for population genetics data analysis. *Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland*.
- Sharma, P., Maffulli, N., 2006. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 6, 181–190.
- Silver, F.H., Freeman, J.W., Seehra, G.P., 2003. Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *J. Biomech.* 36, 1529–1553.
- Thompson, M.W., McInnes, R.R., Willard, H.F., 1991. *Thompson & Thompson: Genetics in Medicine*, 5th ed. (Philadelphia, 500 pp.).
- Vincenti, M.P., 2001. The matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) genes. Transcriptional and posttranscriptional regulation, signal transduction and cell-type-specific expression. *Methods Mol. Biol.* 151, 121–148.
- Visse, R., Nagase, H., 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.* 92 (8), 827–839.
- Xu, X., Wang, L., Xu, C., Zhang, P., Yong, F., Liu, H., Wang, J., Shi, Y., 2013. Variations in matrix metalloproteinase-1, -3, and -9 genes and the risk of acute coronary syndrome and coronary artery disease in the Chinese Han population. *Coron. Artery Dis.* 24 (4), 259–265.

6 CAPITULO II

***“Partial overlapping 1q duplications in two patients with metopic
craniosynostosis”***

Submission id:7002
Manuscript id:201507003

Final Approval 

Manuscript Type Novel Insights from Clinical Practice

Title Partial overlapping 1q duplications in two patients with metopic craniosynostosis

Running Title 1q duplications

Author List Morris M., Baroneza J., Teixeira P., Medina C., Santos M., Versiani B., Roese L., Freitas E., Fonseca A., dos Santos M., Pic-Taylor A., Rosenberg C., Oliveira S., Ferrari I., Mazzeu J.

Keywords

Author Suggested Keywords Distal partial duplication 1q; 1q41q43 duplication; 1q42.13 duplication; fluorescence in situ hybridization (FISH); array CGH; metopic craniosynostosis.

1 Morris et al

Case Report

Partial overlapping 1q duplications in two patients with metopic craniosynostosis

Running title: Chromosome 1q duplications

Marcos L. M. Morris¹, José E. Baroneza², Patricia Teixeira¹, Cristina T. N. Medina³, Mara S. Cordoba³, Beatriz R. Versiani³, Liege L. Roese⁴, Erika L. Freitas⁵, Ana C. S. Fonseca⁵, Maria C. G. dos Santos², Aline Pic-Taylor^{1,6}, Carla Rosenberg⁵, Silviene F. Oliveira^{1,6}, Iris Ferrari⁶, Juliana F. Mazzeu^{1,7*}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, DF, Brazil²Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil³Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, DF, Brazil.⁴Rede Sarah de Hospitais de Reabilitação, DF, Brazil.⁵Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP, Brazil⁶Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, DF, Brazil⁷Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, DF, Brazil

Abstract

Craniosynostosis is the second most common abnormality of craniofacial development and may present in syndromic or non-syndromic forms. Here we report metopic craniosynostosis and other associated malformations in two patients with overlapping 1q duplications detected by G-banding and characterized by array-CGH and FISH. Patient 1 presents a mild phenotype and carries a 22.5 Mb 1q41q43 duplication. Patient 2 presents a pure 1q42.13qter inverted duplication of 21.5Mb, one of the smallest distal 1q duplications ever described and one of the few cases characterized by array CGH, thus contributing to a better characterization of distal 1q duplication syndrome. Both patients present prominent metopic suture therefore pointing to a candidate region for metopic craniosynostosis in the overlapping segment.

KEYWORDS

Distal partial duplication 1q; 1q41q43 duplication; 1q42.13 duplication; fluorescence in situ hybridization (FISH); array CGH; metopic craniosynostosis.

In the last two decades, great advances have been made in our molecular understanding of the etiology and mechanisms associated with abnormalities of embryonic development. Craniosynostosis is characterized by premature closing of one or more cranial sutures due to abnormalities of skull development with compensatory growth of other parts of the face (Persing et al., 1989) and may be associated with syndromes. The metopic form, or trigonocephaly, occurs due to the early closing metopic suture, causing the deformation of the frontal cranial bone, giving the head a triangular shape (Jones et al., 2006). Craniosynostosis is the second most common abnormality of craniofacial development after cleft palate (Wilkie et al., 2001).

In this paper we report a syndromic form of metopic craniosynostosis in two patients with overlapping 1q duplications detected by G-banding and characterized by array-CGH and FISH.

Material and Methods

Clinical Report

Patient 1 - The proband is the first child to healthy, non-consanguineous parents (fig. 1a). She was born by normal delivery at term weighing 2700g (3rd-10th centile). She was first seen by us at the age of 19 years old. Clinical examination showed mild intellectual disability, moderate short stature (3rd-10th centile), low weight (41.4 Kg, < 3rd centile), prominent metopic suture, facial asymmetry, long eyelashes, high nasal root, hypoplastic alae nasi, highly arched palate, maxillary projection, narrow hands and a short fourth right metatarsus. In addition, she has scoliosis and genu valgum.

Patient 2 - The proband is the second child to healthy, non-consanguineous parents (fig.2a). Pregnancy was uneventful and she was delivered by C-section at term with Apgar score 3/10 and showed neonatal asphyxia and jaundice. Birth length was 52cm (75th centile), birth weight 3660g (75th centile) and head circumference 36 cm (50th – 98th centile). She was first seen by us at age five months. It was observed mildly delayed neuropsychomotor development, large anterior fontanel, prominent metopic ridge, glabellar hemangioma, hypertelorism (ICD: 28 mm > 98th centile; OCD: 90 mm > 98th centile), upslanted palpebral fissures, epicanthal folds, large nasal bridge, bulbous nose, smooth philtrum, thin upper lip, large mouth, posteriorly rotated ears with elevated ear lobe, low posterior hairline and short neck. She had pectus excavatum. Her lower limbs showed edema and in the left leg there was a hyperpigmented spot. In the feet there was overlapping of the second and third toes. Echocardiogram revealed a patent foramen ovale.

Patient follow-up at ages: 9 months, 15 months and 18 months did not reveal any other complications.

This study was approved by the institutional ethics committee with the written informed consent of the families.

Cytogenetic analysis

Chromosome analysis of peripheral blood lymphocytes by GTG-banding was performed at 550 or greater banding level. Array-CGH was performed using a whole-genome oligoarray platform consisting of 60,000 oligonucleotides (60K, Agilent Technologies). Labeling, hybridization and post-hybridization washing stages were performed according to the manufacturer's protocol. A scanned image of the microarray was processed using Feature Extraction software and analyzed with Genomic Workbench software (both from Agilent Technologies), with the statistical algorithm ADM-2, and a sensitivity threshold of 6.7. At least 3 consecutive oligonucleotides had to exhibit aberrant log₂ ratios in order to be called by the software as a copy number alteration. FISH with probes mapped to the duplicated segments was performed to investigate the orientation of the duplications.

Results

Patient 1

Chromosome analysis revealed a duplication of the long arm of chromosome 1 (46,XX,dup(1)(q41q43), fig 1b). The mother has a normal karyotype and the father was unavailable for study. Duplication was refined by array-CGH to chromosomal region 1q41q43 to a size of 22.5 Mb (fig. 1c; chr1: 217201257 – 239696544 Assembly NCBI36/hg18; 2006). FISH experiments using probes RP11-239E10 (1q41) and RP11-87P4 (1q42.2) revealed the direct orientation of the duplication (fig. 1d). The patient's final karyotype was 46,XX,dirdup(1)(q41q43).arr1q41q43(217,201,257 – 239,696,544)x3.

Patient 2

Chromosome analysis revealed a mosaic duplication of the long arm of chromosome 1 (46,XX, dup(1)(q43q44),inv(q43p36.3)[16]/46,XX[14], fig.2b). Both parents have a normal karyotype. Array-CGH analysis refined the duplication to chromosomal region 1q42.13-1q44 to a size of 21.5 Mb (Figure 2c; chr1: 225696992–247164526 Assembly NCBI36/hg18; 2006). No deletion at 1p36 was evidenced. FISH experiments using TelVysion 1p SpectrumGreen and TelVysion 1q SpectrumOrange probes (Vysis Inc.) confirmed the inverted orientation of the duplication (fig. 2d). The

patient's final karyotype was 46,XX,dup(1)(q43q44),inv(q43p36.3)[16]/46,XX[14].arr1q42.13-1q44(225,696,992–247,164,526)x3.

Discussion

Patients with pure partial distal trisomy 1q demonstrate a wide range of manifestations of variable severity making it difficult to define a “partial trisomy 1q syndrome”. In most cases, the duplication is the result of an unbalanced translocation with possible imbalance of the other participating chromosome (Concolino et al., 1997; Emberger et al., 2001; Kimya et al., 1979, Percesepe et al., 2007; Utine et al., 2007). It is difficult to evaluate the contribution of the 1q trisomy to the phenotype in cases involving another chromosome. Therefore, cases with pure partial distal trisomy 1q, provide an opportunity to better define the partial distal trisomy 1q syndrome.

Here we report two cases with partially overlapping pure 1q duplications. Patient 1 has a previously unreported interstitial duplication involving only segments 1q41q43. A partially overlapping duplication has been described on Decipher (251817) on a patient with facial abnormalities, proportionate short stature and intellectual disability, a phenotype concordant with our patient. Another patient has been presented with a 19.4 Mb duplication in 1q41q43 [Bartnik et al., 2014] and clinical features including delayed psychomotor development, mild intellectual disability and dysmorphic features. Despite presenting with a large 22.5 Mb duplication, her overall phenotype is mild.

The duplication in Patient 1 overlaps the critical region for 1q41q42 microdeletion syndrome [Shaffer et al., 2007; Mazzeu et al., 2010; Rosenfeld et al., 2011]. To the best of our knowledge, the reciprocal microduplication for the 1q41q42 segment has not been described to date. Since these patients present with duplications of much larger segments and have mild phenotypes, it is possible that the reciprocal 1q41q42 microduplication causes a mild effect or has no pathogenic effect.

The duplication in Patient 2 is one of the few cases with pure distal 1q duplications characterized by array-CGH involving only 1q43q44. Patients with pure partial distal trisomy 1q demonstrate a wide range of manifestations of variable severity. Distal 1q duplication syndrome can be characterized by the signs present in almost all previously reported cases, namely intellectual disability /delayed neuropsychomotor development, triangular face, slanted and narrow palpebral fissures, broad nasal bridge, pointed small nose, micrognathia, low-set and posteriorly rotated ears with poorly formed helices, as reviewed in Table 1. Heart defects have been found in all patients except for those reported by Lungarotti and Kimya [Lungarotti et al., 1979; Kimya et al., 1979]. Though not described in all patients, cardiac defects are a

common finding and therefore should be evaluated in patients with distal duplication 1q. Patient 2 presents one of the smaller duplications reported (1q42.13qter) and in mosaic. However, her clinical signs are consistent with the distal trisomy 1q phenotype thus pointing to a more significant contribution of terminal duplicated segments to the distal 1q syndrome. The duplication is inverted and translocated to chromosome 1p without detectable distal deletion of 1pter as confirmed by array-CGH and FISH. All previously described cases in which 1pter deletion has been investigated had 1p microdeletions.

Both patients here described have a prominent metopic suture suggesting the presence of a candidate gene for craniosynostosis in the overlapping segment of the two duplications. This paper is one that shows the link between distal duplication 1q and metopic craniosynostosis. In previous studies, other genetic disorders have been described in patients with metopic craniosynostosis such as a point mutation in *FGFR1* (Kress et al., 2000), and microdeletion in *PTPRD* (Choucair et al., 2015). In other types of craniosynostosis other genes have been reported, confirming that the pattern of gene expression in this pathology is heterogeneous and complex. Genetic and molecular studies suggests that factors such as bone morphogenetic proteins (BMPs), fibroblast growth factors (FGFs) and WNTs play an important role in controlling cranial bone formation (Zhou et al., 2009).

Fifty-one OMIM genes map to the region of intersection between the duplications on chromosome 1 (chr1:225696992-239696544g19- hg18), including *WNT9A* and *WNT3A*. From hydra to humans, WNTs plays indisputably important roles in patterning and morphogenesis (Cadigan and Nusse, 1997), including the facial (Brugmann et al., 2007) and the cranial morphogenesis (Behr et al., 2010). Wnt signaling can stimulate differentiation of early osteoblasts and inhibit the mineralization of mature osteoblasts (Eijken et al., 2008)

WNT9A is associated with chondrogenic development of craniofacial structures. Previous studies show that *wnt9a* expression in zebrafish is essential for extension of the median palatine processes during the palatogenesis (Dougherty et al., 2013) and the lower jaw formation (Curtin et al., 2011). *WNT3A* may suppress the chondrogenesis and gene expression in chondrocytes (Reinhold et al., 2006). Although the metopic suture is closed through intramembranous ossification, they are supported by cartilage, which should disappear before calcification (Holmbeck et al., 2003; Sahar et al., 2005). Previous studies in embryo mice showed *Wnt9a* mRNA in calvarian osteoblasts and the supracalvarial injection of *Wnt3a* resulted in complete cartilage degradation (Zhou et al., 2009).

In addition to the *WNT* genes, Mefford et al., 2010 described a patient with coronal synostosis and a 2.5 Mb microduplication at 1q43 (chr1:239,34-240,99, hg18) and proposed *RGS7* gene as a candidate for craniosynostosis. This gene is the last gene duplicated in Patient 1, close to the distal breakpoint and in the overlapping segment of the two duplications. No other genes in the overlapping segment have been proposed as candidates for craniosynostosis and therefore our data reinforces a possible role of *RGS7*, *WNT9A* and *WNT3A* in the etiology of cranial suture malformations.

Acknowledgements

We thank Rede Sarah de Hospitais de Reabilitação for conducting part of the G-banding and FISH experiments. Grant support: Decanato de Pesquisa e Pós-graduação, Universidade de Brasília; Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal e Ministério da Saúde, PPSUS 2010 e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

References

- Bartnik M, Nowakowska B, Derwinska K, Wisniowiecka-Kowalnik B, Kedzior M, Bernaciak J, Ziemkiewicz K, Gambin T, Sykulski M, Bezniakow J, Komiszewski L, Kutkowska-Kazmierczak A, Klapecki J, Szczaluba K, Shaw CA, Mazurczak T, Gambin A, Obersztyn E, Bocian E, Stankiewicz P. 2014. Application of array comparative genomic hybridization in 255 patients with developmental delay or intellectual disability. *J Appl Genetics* 55:125-144
- Bartsch C, Aslan M, Kohler J. 2001. Duplication dup(1)(q32q44) detected by comparative genomic hybridization (CGH): further delineation of trisomies 1q. *Fetal Diagn Ther* 16(5): 265–273.
- Behr B, Longaker MT, Quarto N. 2010. Differential activation of canonical Wnt Signaling determines cranial sutures fate: a novel mechanism for sagittal suture craniosynostosis. 2010. *Dev. Biol.* 344(2): 922-40.
- Brugmann SA, Goodnough LH, Gregorieff A, Leucht P, ten Berge D, Fuerer C, Clevers H, Nusse R, Helms JA. 2007. Wnt signaling mediates regional specification in the vertebrate face. *Development* 134(18): 3283-95.
- Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. 1997. *Genes Dev.* 11(24): 3286-305
- Choucair N, Micnon-Ravix C, Cacciagli P, Abou-Ghoch J, Fawaz A, Megarbane A, Villart L, Chouery E. 2015. Evidence that homozygous PTPRD gene microdeletion causes trigonocephaly, hearing loss, and intellectual disability. *Mol. Cytogenet.* 8(39): 1-8.
- Clark BK, Lowther GW, Lee WR. 1994. Congenital ocular defects associated with an abnormality of the human chromosome 1: Trisomy 1q32-qter. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 31: 41–45.
- Concolino D, Cinti R, Ferraro L, Moricca MT, Strisciuglio P. 1998. Partial Trisomy 1(q42→qter): a new case with a mild phenotype. *J Med Genet* 35: 75 – 77.
- Cox AA, Jezewski PA, Fang PK, Payne-Ferreira TL. 2010. Zebrafish Wnt9a,9b paralog comparisons suggest ancestral roles for Wnt9 in neural, oral-pharyngeal ectoderm and mesendoderm. 2010. *Gene Expression Patterns* 10(6): 251-258.
- Curtin E, Hickey G, Kamel G, Davidson AJ, Liao EC. 2011. Zebrafish wnt9a is expressed in pharyngeal ectoderm and is required for palate and lower jaw development. *Mech. Dev.* 128(1-2): 104 – 105.
- Doughert M, Kamel G, Grimaldi M, Gfrerer L, Shubinets V, Ethier R, Hickey G, Cornell RA, Liao EC. 2013. Distinct requirements for wnt9a and irf6 in extension and integration mechanisms during zebrafish palate morphogenesis. *Development* 140(1): 76 – 81.

- Duba HC, Erdel M, Löffler J, Bereuther L, Fisher H, Utermann B, Utermann G. 1997. Detection of a de novo duplication of 1q32-qter by fluorescence in situ hybridisation in a boy with multiple malformations: further delineation of the trisomy 1q syndrome, *J Med Genet* 34: 309 – 313.
- Eijken M, Meijer IM, Westbroek I, Koedam M, Chiba H, Uitterlinden AG, Pols HA, van Leeuwen JP. 2008. Wnt signaling acts and is regulated in a human osteoblast differentiation dependent manner. *J. Cell. Biochem.* 104(2): 568 – 79.
- Emberger W, Petek E, Kroisel PM, Zierler H, Wagner K. 2001. Clinical and molecular cytogenetic characterization of two patients with partial trisomy 1q41-qter: Further delineation of partial trisomy 1q syndrome, *Am J Med Genet* 104: 312 - 318.
- Flatz S, Fonatsch C. 1979. Partial trisomy 1q due to tandem duplication. *Clin. Genet.* 15: 541 – 542.
- Jones KL. (2006). *Smith's Recognizable Patterns of Human Malformations*, 6th ed. Elsevier.
- Kimya Y, Yakut T, Egeli U, Ozerkan K. 1979. Prenatal diagnosis of a fetus with pure partial trisomy 1q32-44 due to a familial balanced rearrangement. *Prenat Diagn* 22(11): 957–961.
- Kress W, Petersen B, Collmann H, Grimm T. 2000. An unusual FGFR1 mutation (fibroblast growth factor receptor 1 mutation) in a girl with non-syndromic trigonocephaly. *Cytogenet. Cell. Genet.* 91: 138 - 40.
- Kulikowski L D, Belluco F T S, Nogueira SI, Christofolini DM, Smith MAC, De Melo CB, Brunoni D, Melaragno MI. 2008. Clinical Report: Pure Duplication 1q41-qter: Further delineation of trisomy 1q syndromes. *Am J Med Genet* 146 A: 2663 - 2667.
- Luigarotti MS, Falomi A, Calabro A, Passalacqua F, Dallapiccola B. 1979. De novo duplication 1q32-q42: Variability of phenotypic features in partial 1q trisomies, *J Med Genet* 17: 398 – 402.
- Mazzeu JF, Vianna-Morgante AM, Krepschi AC, Oudakker A, Rosenberg C, Szuhai K, McGill J, Maccraughan J, van Bokhoven H, Brunner HG. 2010. Deletions encompassing 1q41q42.1 and clinical features of autosomal dominant Robinow syndrome. *Clin Genet* 77(4): 404 - 7.
- Nowaczyk, M J M, Bayani, J, Freeman V, Watts, J, Squire, J, Xu J. 2003. De Novo 1q32q44 duplication and distal 1q trisomy syndrome. *Am J Med Genet* 120A: 229 - 233
- Percesepe, A, Lugli L, Pierluigi M, Cavani S, Malacarne M, Roversi, M.F, Ferrari F, Forabosco 2007 A. Pure Segmental Trisomy 1q42-qter in a Boy with a severe phenotype. *Am J Med Genet* 143A: 2339 - 2342.
- Persing JA, Jane JA, Shaffrey M. 1989. Virchow and the pathogenesis of craniosynostosis: a translation of his original work. *Plast. Reconstr. Surg.* 83(4): 738 - 42.
- Renhold MI, Kapadia RM, Liao Z, Naski MC. The Wnt-inducible transcription factor Twist1 inhibits chondrogenesis. 2006. *J. Biol. Chem.* 281(3): 1381-8.
- Rosenfeld JA, Lacassie Y, El-Khechen D, Escobar LF, Reggin J, Heuer C, Chen E, Jenkins LS, Collins AT, Zinner S, Babcock M, Morrow B, Schultz RA, Torchia BS, Ballif BC, Tsuchiya KD, Shaffer LG. 2011. New cases and refinement of the critical region in the 1q41q42 microdeletion syndrome. *Eur J Med Genet* 54(1):42-9.
- Shaffer LG, Theisen A, Bejjani BA, Ballif BC, Avlsworth AS, Lim C, McDonald M, Ellison JW, Kostiner D, Saitta S, Shaikt T. 2007. The discovery of microdeletion syndromes in the post-genomic era: review of the methodology and characterization of a new 1q41q42 microdeletion syndrome. *Genet Med* 9(9):607-16.
- Sillén A, Wadelius C, Annerén G. 1998. Boy with an interstitial 1q (q31q41) duplication confirmed by Fluorescent in Situ Hybridisation. *Am J Med Genet* 80:163-168

- Steffensen DM, Chu EHY, Speert DP, Wall PM, Meilinger K, Kelch RP. 1977. Partial trisomy of the long arm of human chromosome 1 as demonstrated by in situ hybridization with 5S ribosomal RNA. *Hum. Genet.* 36: 25-33.
- Utin GE, Aktas D, Alanay Y, Gucer S, Tuncbilek E, Mrasek K, Liehr T. 2007. Distal partial Trisomy 1q: report of two cases and review of the literature. *Pren Diagn* 27: 865-871.
- Van Haelst MM, Eussen HJ, Visscher F, de Rujter JL, Drop SL, Lindhout D, et al. Silver-Russel phenotype in a patient with pure trisomy 1q32.1-q42.1: further delineation of the pure 1q trisomy syndrome. 2002. *J Med Genet* 39(8):582-5.
- Wilkie AO, Morris-Kay GM. 2001. Genetics of craniofacial development and malformation. *Nat. Rev. Genet.* 2(6): 458-68.
- Zhou H, Mak W, Kalak R, Street J, Fong-Yee C, Zheng Y, Dunstan C, Seibel MJ. 2009. Glucocorticoid-dependent Wnt signaling by mature osteoblasts is a key regulator of cranial skeletal development in mice. *Development* 136: 427-436.

10 Morris et al

Feature	[Utine et al., 2007] Patient 1	[Fitz et al., 1979]	[Steffensen et al., 1977]	[Balasubramanian et al., 2008]	[Clark et al., 1994]	[Nowaczyk et al., 2002]	[Polityko et al., 2005] Patient B	[Duba et al., 1997]	[Kimura et al., 1979]	[Bartsch et al., 2001]	Present case 2
Cytogenetic Studies	FISH (MCB)			osCGH, G-Banded +FISH and MLPA			FISH (MCB)	GTG banded and FISH	GTG banded and FISH		aCGH, G-Banded +FISH
Cytogenetic aberration	dup (1)(q31-q32)	dup(1)(q32-q44)	dup(1)(q32-q44)	inv dup(1)(q31-q43)	dup(1)(q32-q44)	G-Banded, FISH (WCP) and CGH	dup(1)(q31-q44)	dup(1)(q32-q44)	dup(1)(q32-q44)	dup(1)(q42,13q44)	dup(1)(q42,13q44)
Triangular face	+	+	+	+	+	+	?	+	-	+	+
Long face	+	+	+	+	?	?	?	?	?	-	-
Long and smooth philtrum	?	?	-	?	?	?	-	?	?	-	+
Micrognathia	+	?	-	?	?	?	?	?	-	+	+
Narrow palpebral fissures	+	+	+	+	+	+	?	+	?	-	+
Microphthalmia	+	?	-	?	?	?	?	?	?	-	-
Wide and flat nasal bridge	+	+	+	+	?	+	-	+	-	+	+
Cleft lip/palate	+	-	-	-	-	-	?	+	-	-	-
High palate	?	?	?	?	?	+	?	?	-	-	+
Low-set ears	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
Posteriorly rotated ears	+	+	+	+	+	+	-	+	?	+	+
Poorly formed helices	+	+	+	+	+	-	?	+	?	-	+
Patent ductus arteriosus	-	?	+	-	-	+	?	-	-	-	-
Patent foramen ovale	-	?	+	-	-	?	?	-	-	-	+
Other heart Defect	+	?	+	+	+	+	?	+	-	+	-
Double right renal artery	+	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-
Meckel diverticulum	+	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-
Long fingers and toes	+	-	+	-	-	-	?	-	-	-	+
Camptodactyly	+	-	-	-	-	-	?	-	-	+	-
Preaxial polydactyly	+	-	-	-	-	-	?	+	-	-	-

Table 1 – Clinical signs of distal trisomy 1q. Adapted from Utine (2007)

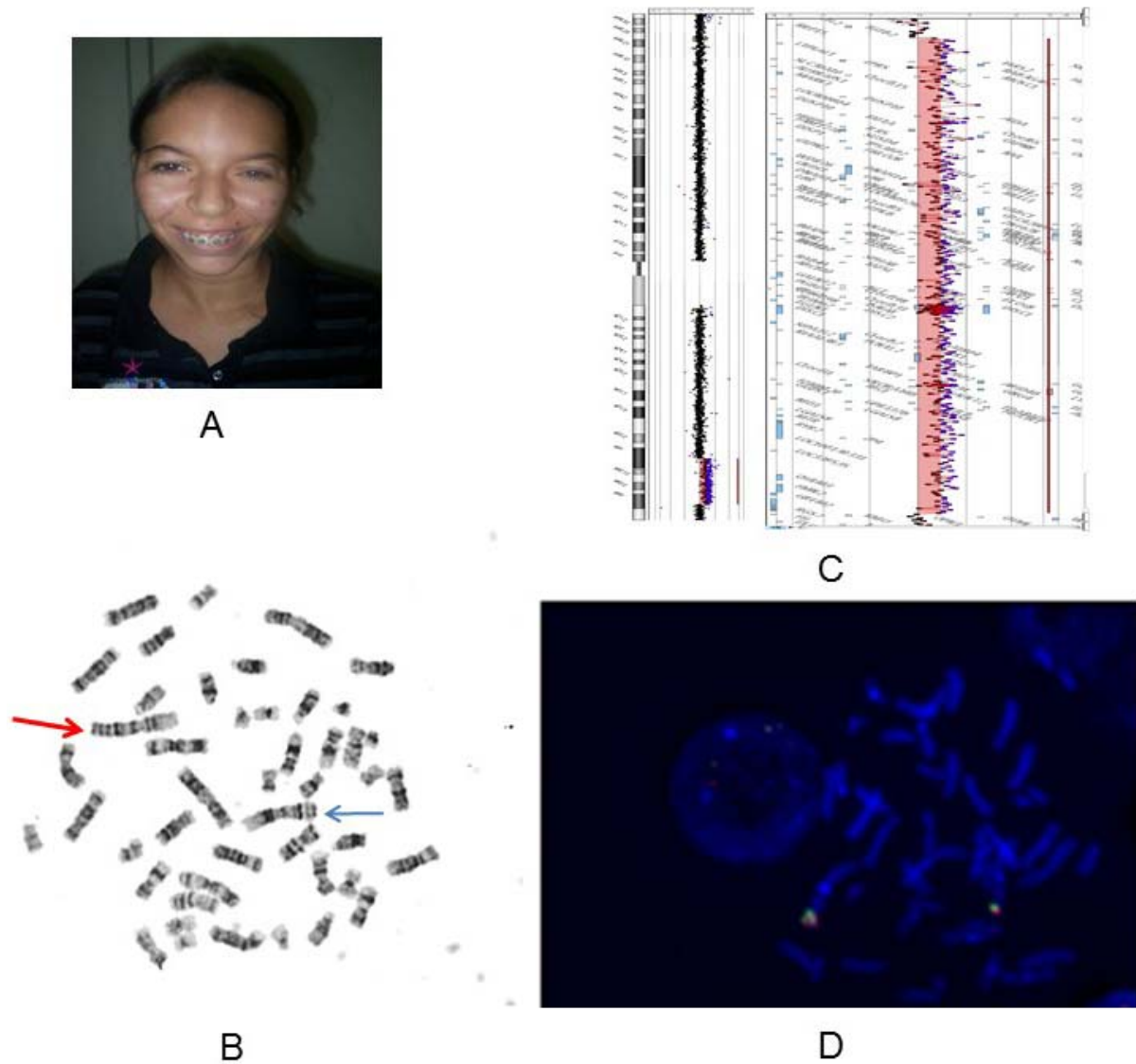


Figure 1: (a) Patient at age 19 years old showing mild facial dysmorphisms. (b) Metaphase after G-banding showing 1q41q43 duplication. Red arrows point to duplicated chromosome 1. Blue arrow points to normal chromosome 1. (c) Mapping of the duplication on a 60k oligo array. (d) Determination of orientation of the duplication by double-colored FISH. Hybridization with probes RP11-239E10 (green) and RP11-87P4 (red) showing the direct orientation of the 1q41q43 duplication in Patient 1.

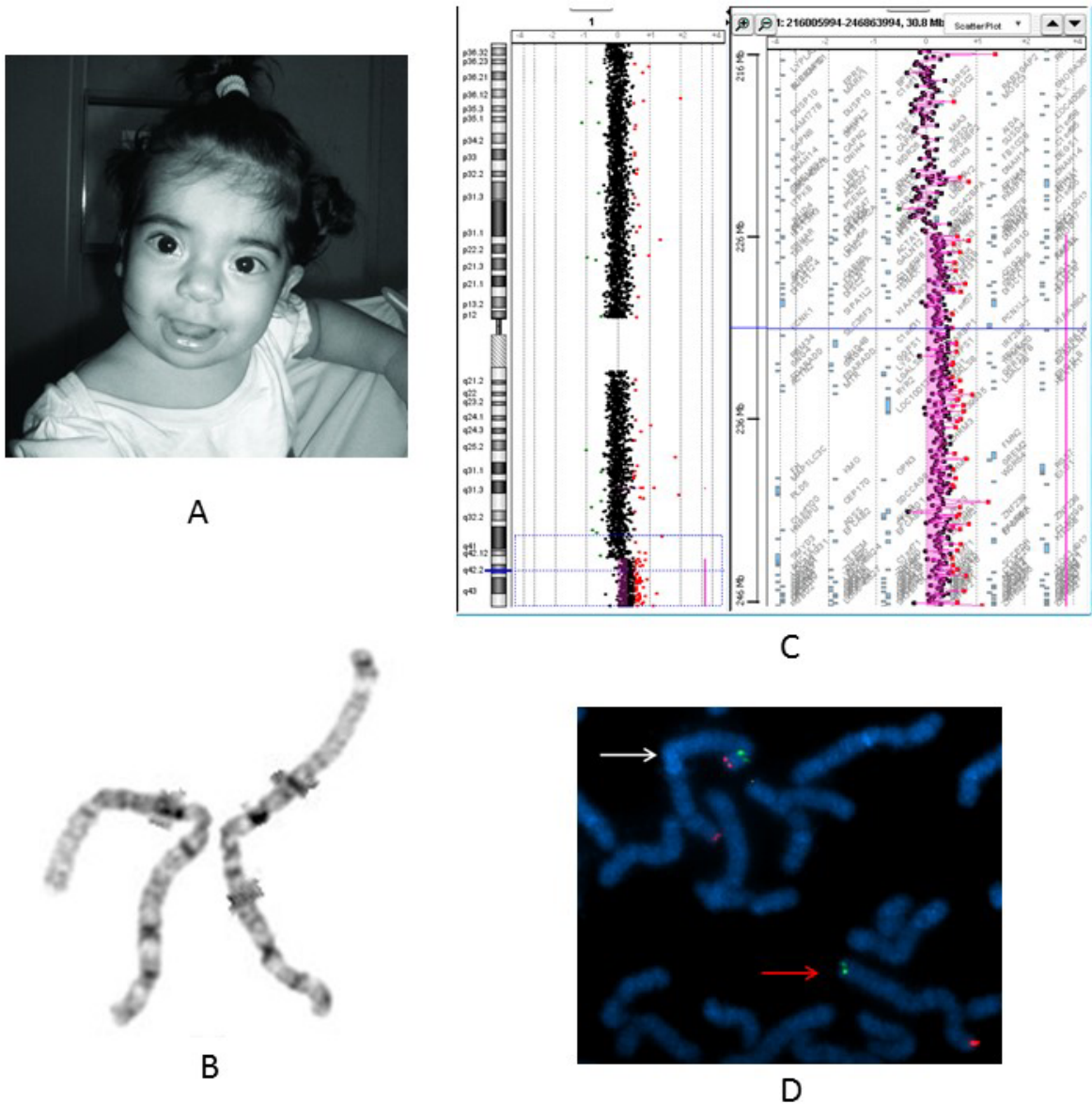


Figure 2: (a) Patient at age 18 months showing facial dysmorphisms. (b) Metaphase after G-banding showing 1q42q44 duplication. Left- Normal chromosome, Right – Duplicated chromosome. (c) Mapping of the duplication on a 60k oligo array. (d) Hybridization with TelVysion 1p SpectrumGreen and TelVysion 1q SpectrumOrange probes confirmed the inverted orientation of the 1q42q44 duplication in Patient 2. White arrows- duplicated chromosomes. Red arrows- normal chromosomes.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com a revisão apresentada na introdução desta tese, atualmente muitos estudos têm sido conduzidos no sentido de analisar as alterações genéticas e moleculares relacionadas à origem, ao desenvolvimento e às consequências das doenças do tecido conjuntivo. As conclusões obtidas por meio destes estudos têm mudado a visão da medicina a respeito da etiologia de muitas doenças e são precedidas de discussões que convergem e integram distintas áreas da ciência.

Este trabalho promoveu a parceria de três importantes Universidades brasileiras: a Universidade Federal do Paraná, a Universidade de São Paulo e a Universidade de Brasília, na disponibilização da melhor infraestrutura para oportunizar o estudo genético de duas importantes doenças do tecido conjuntivo: a tendinopatia do tibial posterior e a craniossinostose. A parceria permitiu o treinamento na execução de diferentes metodologias de análise genética e oportunizou o diálogo com especialistas em diferentes áreas na tentativa de conduzir a discussão de nossos resultados.

A partir da análise de nossos resultados podemos concluir que o polimorfismo rs1144393 na região promotora (-519) do gene da metaloprotease de matriz extracelular do tipo 1 (MMP-1), está associado à tendinopatia primária do tibial posterior e pode ser utilizado como marcador genético de risco à insuficiência do tendão tibial posterior. Além disso, as combinações haplotípicas dos polimorfismos da MMP-1 (-1607 e -519) (rs1799750 e rs1144393) influenciam a tendinopatia primária no tibial posterior em mulheres, sendo, os haplótipos G-2G e A-2G de risco a esta tendinopatia.

Os resultados demonstram que o método de extração de DNA utilizado foi adequado para obtenção de quantidades suficientes de DNA. A amplificação dos fragmentos por técnica de PCR tiveram suas condições otimizadas e a escolha da enzima de restrição para a técnica de RFLP foi adequada para a análise dos polimorfismos estudados. Assim, com metodologia reprodutível, de baixo custo e pouco invasiva, foi possível identificar marcadores moleculares para pacientes com tendinopatia primária do tendão tibial posterior.

MMP-1 é uma collagenase intersticial cuja expressão desregulada pode causar prejuízo nos tecidos que possuem funções dependentes da organização da matriz extracelular. Entre estes tecidos observa-se o conjuntivo propriamente dito do tipo denso, rico em colágeno, característico dos tendões. Na disfunção do tendão tibial posterior é observado aumento dos níveis de colágenos do tipo III, IV e V e diminuição de colágeno tipo I; o qual apresenta uma distribuição difusa e é envolvido por fibrilas do tipo III. Acreditamos que os polimorfismos estudados na MMP-1 podem estar contribuindo para alterar os colágenos dos tipos I e III no tibial posterior, aumentando sua degradação e assim predispondo a tendinopatia desse tendão. Nosso estudo demonstrou que polimorfismos em MMP-1, isolados ou em haplótipo, estão associados à insuficiência do tendão tibial posterior.

No estudo genético de portadores de craniossinostose não síndrômica foi possível avaliar, por meio de microarranjos de DNA, amostras de 13 indivíduos atendidos pelo serviço de genética do Hospital Universitário de Brasília, que não possuíam evidências de ligação entre a craniossinostose e as síndromes genéticas já conhecidas. Todos os pacientes haviam sido previamente submetidos à cariotipagem. Destes, em dois portadores de trigonocefalia, a forma de craniossinostose cuja origem está na fusão precoce da sutura metópica, foi observada duplicação parcial distal de um segmento do braço longo do cromossomo 1. Ao analisar os genes contidos neste segmento, verificamos a presença de três deles que, devido a estudos anteriores, acreditamos estar envolvidos na etiologia da craniossinostose: *WNT3A*, *WNT9A* e *RGS7*.

Por fim, entendemos que com a realização deste trabalho contribuímos para a literatura científica e reforçamos a relação entre a histologia, a patologia e a genética na caracterização de doenças do tecido conjuntivo. Devido à complexidade das patologias estudadas, futuros projetos devem ser realizados na tentativa de melhor caracterizá-las, entre eles o estudo funcional da expressão de *WNT9A* e *WNT3A* no desenvolvimento das suturas craniais e a análise de outros polimorfismos atuando isoladamente ou em conjunto na tendinopatia do tibial posterior.

REFERÊNCIAS

- ADAMO, C. T; MAILHOT, J. M; SMITH, A. K; BORKE, J. L. Connexin-43 expression in oral-derived human osteoblasts after transforming growth factor-beta and prostaglandin E2 exposure. **Journal of Oral Implantology**, v. 27, p. 25-31, 2001.
- ALBERTS, B; JOHNSON, A; JULIAN, L; RAFF, M; KEITH, R; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 5.ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2010.
- ALEXANDER, C. M; WERB, Z. Extracellular matrix degradation. *In*: HAY, E. D. **Cell Biology of Extracellular Matrix**, 2.ed. New York: Plenum Press, 1991. p. 255-302.
- BEEDERMAN, M; FARINA, E. M; REID, R. R. Molecular basis of cranial suture biology and disease: Osteoblastic and osteoclastic perspectives. **Genes and Diseases**, v. 1, n. 1, p. 120-125, 2014.
- BURGER, M. C; De WET, H; COLLINS, M. The BGN and ACAN genes and carpal tunnel syndrome. **Gene**, v. 551, n. 2, p. 160-6, 2014.
- BURGER, M; De WET, H; COLLINS, M. The COL5A1 gene is associated with increased risk of carpal tunnel syndrome. **Clinical Rheumatology**, v. 34, n. 4, p. 767-74, 2015.
- CADIGAN, K. M; NUSSE, r. Wnt signaling: a common theme in animal development. **Genes & Development**, v. 11, n. 24, p. 3286=305, 1997.
- CHABROLLE, J. P; BENSOUDA, B; BRUEL, H; SIMON, A; POINSOT, J; ICKOWICZ, V; DEGRE, S. Metopic craniosynostosis, probable effect of intrauterine exposure to maternal valproate treatment. **Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine Journal**, v. 8, n. 12, p. 1333-6, 2001.
- CHOUCAIR, N; MIGNON-RAVIX, C; CACCIAGLI, P; ABOU GHOUGH, J; FAWAZ, A; MEGARBANE, A; VILLARD, L; CHOUERY, E. Evidence that homozygous PTPRD gene microdeletion causes trigonocephaly, hearing loss, and intellectual disability. **Molecular Cytogenetics**, v. 8, n. 39, doi: 10.1186/s13039-015-0149-0, 2015. Acesso em 21 de outubro de 2015. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4469107/pdf/13039_2015_Article_149.pdf
- CHOTAI, K. A; BRUETON, L. A; VAN HERWERDEN, L; GARRETT, C; HINKEL, G. K. SCHINZEL, A; MUELLER, R. F; SPELEMAN, F; WINTER, R. M. Six cases of 7p deletion: clinical, cytogenetic, and molecular studies. **American Journal of Medical Genetics**, v. 51, n. 3, p. 270-6, 1994.
- CLARK, A. F. **The molecular and cellular biology of wound repair**. 2.ed. New York: Springer, 1996, 611p.
- COLLINS, M; RALEIGH, S. M. Genetic risk factors for musculoskeletal soft tissue injuries. **Medicine and Sport Science**, v. 54, p. 136-45, 2009.

CURTIN, E., HICKEY, G., KAMEL, G., DAVIDSON, A. J., LIAO, E. C. Zebrafish *wnt9a* is expressed in pharyngeal ectoderm and is required for palate and lower jaw development. **Mechanisms of Development**, n. 128, v. 1-2, p. 104-105, 2011.

CRRIST, L.A; CROWE, C.A; MICALE, M.A; CONROY, J.M; SCHWARTZ, S. Chromosome breakage hotspots and delineation of the critical region for the 9p-deletion syndrome. **American Journal of Human Genetics**, v.65, p.1387-95, 1999.

DELAND, J. T; DE ASLA, R. J; SUNG, I. H; EMBERG, L. A; POTTER, H. G: Posterior tibial tendon insufficiency: which ligaments are involved? **Foot & Ankle International**, n. 26, v. 6, p. 427-35, 2005.

DOUGHERTY, M; KAMEL, G; GRIMALDI, M; GFRER, L; SHUBINETS, V; ETHIER, R; HICKEY, G; CORNELL, R. A; LIAO, E. C. Distinct requirements for *wnt9a* and *irf6* in extension and integration mechanisms during zebrafish palate morphogenesis. **Development**, v. 140, n. 1, p. 76-81, 2013.

EL KHOURY, L; POSTHUMUS, M; COLLINS, M; HANDLEY, C. J; COOK, J; RALEIGH, S. M. Polymorphic variation within the ADAMTS2, ADAMTS14, ADAMTS5, ADAM12 and TIMP2 genes and the risk of Achilles tendon pathology: a genetic association study. **Journal of the Science and Medicine in Sport**, v. 16, n. 6, p. 493-8, 2013.

FICK, K; CIESZCZYK, P; KACZMARCZYK, M; MACIEJEWSKA-KARŁOWSKA, A; SAWCZUK, M; CHOLEWINSKI, J; LEONSKA-DUNIEC, A; STEPIEN-SLODKOWSKA, M; ZAREBSKA, A; STEPTO, N. K; BISHOP, D. J; EYNON, N. Gene variants within the COL1A1 gene are associated with reduced anterior cruciate ligament injury in professional soccer players. **Journal of the Science and Medicine in Sport**, v. 16, n. 5, p. 396-400, 2013.

FREY, C; SHEREFF, M; GREENIDGE N. Vascularity of the posterior tibial tendon. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 72-A, p. 884-88, 1990.

FUNK, D; CASS, J. R; JOHNSON, K. A.: Acquired adult flat foot secondary to posterior tibial-tendon pathology. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 68-A, p. 95-102, 1986.

GALASSO, O; IACCINO, E; GALLWILLI, L; PERROTA, I; CONFORTI, F; DONATO, G; GASPARINI, G. Collagen Type V in Spontaneous Quadriceps Tendon Ruptures. **Orthopedics**, v. 35, n. 4, p. 580-584, 2012.

GODOY-SANTOS, A; CUNHA, M. V; ORTIZ, R. T; FERNANDES, T. F; MATTAR, R. Jr; DOS SANTOS, M. C. MMP-1 promoter polymorphism is associated with primary tendinopathy of the posterior tibial tendon. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 31, n. 7, p. 1103-7, 2013.

GODOY-SANTOS, A; ORTIZ, R. T; JUNIOR, R. M; FERNANDES, T. D; SANTOS, M. C. MMP-8 polymorphism is genetic marker to tendinopathy primary posterior tibial tendon. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 24, n. 1, p. 220-3, 2014.

GREIVES, M.R; ODESSY, E.A; WAGGONER, D.J; SHENAG, D.S; ARADHYA, S; MITCHELL, A; WHITCOMB, E; WARSHAWSKY, N; HE, T.C; REIDD, R.R. RUNX2 quadruplication: additional evidence toward a new form of syndromic craniosynostosis. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 24, n. 1, p. 126-129, 2013.

HAY, M; PATRICIOS, J; COLLINS, R; BRANFIELD, A; COOK, J; HANDLEY, C.J; SEPTEMBER, A.V; POSTHUMUS, M; COLLINS, M. Association of type XI collagen genes with chronic Achilles tendinopathy in independent populations from South Africa and Australia. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 47, n. 9, p. 569-74, 2013.

HIGGINBOTTOM, M.C; JONES, K.L; JAMES, H.E. Intrauterine constraint and craniosynostosis. **Neurosurgery**, v. 6, n. 1, p. 39-44, 1980.

HOLMES GB JR, MANN RA: Possible etiologic factors associated with rupture of the posterior tibial tendon. **Foot & Ankle International**, v. 13, p. 70-79, 1992.

JABS, E. W; MULLER, U; LI, X; MA, L; LUO, W; HAWORTH, I. S; KLISAK, I; SPARKES, R; WARMAN, M. L; MULLIKEN, J. B; SNEAD, M. L; MAXSON, R. A mutation in the homeodomain of the human MSX2 gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis. **Cell**, v. 75, p. 443-450, 1993.

JACOB, S; W. U. C; FREEMAN, T. A; KOYAMA, E; KIRSCHNER, R. Expression of Indian Hedgehog, BMP-4 and Noggin in Craniosynostosis Induced by Fetal Constraint. **Annals of Plastic Surgery**, v. 58, n. 2, p. 215-221, 2007.

JAHSS, M. H: **Tendon disorders of the foot and ankle. In Disorders of the Foot and Ankle. Medical and Surgical Management**. Philadelphia, W. B. Saunders, 1991. Pp. 1461-1513

JOHNSON, D; WALL, S; MANN, S; WILKIE, A. A novel mutation, Ala315Ser, in FGFR2: a gene environment interaction leading to craniosynostosis. **European Journal of Human Genetics**, v. 8, p. 571-7, 2000.

JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KIDNER, F. C. The prehallux in relation to flatfoot. **Jama – Journal of The American Medical Association**, v. 101, p. 1539-1542, 1933.

KOSCHNAU, S; MELHUS, H; JACOBSON, A; RAHME, H; BENGTSSON, H; RIBOM, E; GRUNDBERG, E; MALLMIN, H; MICHAELSSON, K. Type I Collagen $\alpha 1$ Sp1 Polymorphism and the Risk of Cruciate Ligament Ruptures or Shoulder Dislocations. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 36, n. 12, p. 2432-2436, 2008.

KRESS, W; PETERSEN, B; COLLMANN, H; GRIMM, T. An unusual FGFR1 mutation (fibroblast growth factor receptor 1 mutation) in a girl with non-syndromic trigonocephaly. **Cytogenet Cell Genet**, n. 91, p. 138-40, 2000.

KHOURY, E. I; POSTHUMUS, M; COLLINS, M; HANDLEY, M; COOK, J; RALEIGH, S. M. Polymorphic variation within the ADAMTS2, ADAMTS14, ADAMTS5, ADAM12

and TIMP2 genes and the risk of Achilles tendon pathology: a genetic association study. **Jornal of Science and Medicin in Sport**, v. 16, n. 6, p. 493-8, 2013

LAJEUNIE, E; LE MERRER, M; BONAITE-PELLIE, C; MARCHAC, D; RENIER, D. Genetic study of nonsyndromic coronal craniosynostosis. **American Journal of Medical Genetics**, v. 55, n. 4, p. 500-4, 1995.

LEE, J. C; SPIGUEL, L; SHENAG, D. S; ZHONG, M; WIETHOLT, C; HE, T. C; REID, R. R. Role of RANK-RANKL-OPG axis in cranial suture homeostasis. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 22, n. 2; p. 699–705, 2012.

LEWANDA, A; MORSEY, S; REID, C; JABS E. Two craniosynostotic patients with 11q deletions, and review of 48 cases. **American Journal of Medical Genetics**, n. 59, p. 193–8, 1995.

LIAN, A. J; HSU, W; WESTENDORF, J. J. Runx2 protein represses Axin2 expression in osteoblasts and is required for craniosynostosis in Axin2-deficient mice. **The Journal of Biological Chemistry**, v.288, n. 8, p. 5291-302, 2013.

LONGO, U. G; FAZIO, V; POETA, M. L; RABITTI, C; FRANCESCHI, F; MAFFULI, N; DENARO, V. Bilateral consecutive rupture of quadriceps tendo in a man with BstUI polymorphism of the COL5A1 gene. **Knee**, v. 18, p. 514-518, 2010.

MAGRA, M; MAFFULLI, N. Genetic aspects of tendinopathy. **Journal of the Science and Medicine in Sport**, v. 11, n. 3, p. 243-7, 2008.

MALILA, S; YUKTANANDANA, P; SAOWAPRUT, S; JIAMJARASRANGSI, W; HONSAWEK, S. Association between matrix metalloproteinase-3 polymorphism and anterior cruciate ligament ruptures. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 4, p. 4158-65, 2011.

MANN, R. A. Flatfoot in Adults. In **Surgery of the Foot and Ankle**. ed 6. St Louis: C. V. Mosby, 1993. p. 757-784.

MARSH, J. M; GURLEY, J. M; KANE, A. A. **Nonsyndromic craniosynostosis**. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006. p. 135-194.

MEFFORD, H. C; SHAFER, N; ANTONACCI, F; TSAI, J. M; PARK, S. S; HING, A. V; RIEDER, M. J; SMYTH, M. D; SPELTZ, M. L; EICHLER, E. E; CUNNINGHAM, M. L. Copy number variation analysis in single-suture craniosynostosis: multiple rare variants including RUNX2 duplication in two cousins with metopic craniosynostosis. **American Journal of Medical Genetics**, v. 152A, n. 9, p. 2203-10, 2010.

MERRILL, A. E; BOCHUKOVA, E. G; BRUGGER, S. M; ISHII, M; PILZ, D.T. Cell mixing at a neural crest-mesoderm boundary and deficient ephrin-Eph signaling in the pathogenesis of craniosynostosis. **Human Molecular Genetics**, v. 15, p. 1319-28, 2006.

METZGER, I. F; SOUZA-COSTA, D. C; TANUS-SANTOS, J. E. Farmacogenética: princípios, aplicações e perspectivas. **Ribeirão Preto: Medicina**, v. 39, n. 4, p. 515-521, 2006.

MOKONE, G.G; GAJJAR, M; SEPTEMBER, A. V; SCHWELLNUS, M.P; GREENBERG, J; NOAKES, T.D; COLLINS, M. The guanine-thymine dinucleotide repeat polymorphism within the tenascin-C gene is associated with achilles tendon injuries. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 33, n. 7, p. 1016-1021, 2005.

MOKONE, G.G; SCHWELLNUS, M; NOAKES, T.D; COLLINS, M. The COL5A1 gene and Achilles tendon pathology. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 16, n. 1, p. 19-26, 2006.

MOLONEY, D; WALL, S; ASHWORTH, G; OLDRIDGE, M; GLASS, I; FRANCOMANO, C. A; MUENKE, M; WILKIE, A. O. Prevalence of Pro250Arg mutation of fibroblast growth factor receptor 3 in coronal craniosynostosis. **Lancet**, v. 349, p. 1059–62, 1997.

MOTTA GDA, R; AMARAL, M. V; REZENDE, E; PITTA, R; VIEIRA, T. C; DUARTE, M. E; VIEIRA, A. R; CASADO, P. L. Evidence of genetic variations associated with rotator cuff disease. **Journal of Shoulder and Elbow Surger**, v. 23, n. 2, p. 227-35, 2014.

MURPHY-RYAN, M; PSYCHOGIOS, A; LINDOR, N.M. Hereditary disorders of connective tissue: A guide to the emerging differential diagnosis. **Genetics in Medicine**, v. 12, p. 344-354, 2010.

NACAMULI, R.P; FONG, K.D; LENTON, K.A.. Expression and possible mechanisms of regulation of BMP3 in rat cranial sutures. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 116, n. 5, p. 1353-1362, 2005.

OOSTERVEER, D. M; VERMISSEN, J; YAZDANPANA, M; HAMZA, T. H; SIJBRANDS, E. J. Differences in characteristics and risk of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia patients with and without tendon xanthomas: a systematic review and meta-analysis. **Atherosclerosis**, v. 207, n. 2, p. 311-317, 2009.

OPPERMAN, L. A; NOLEN, A. A; OGLE, R. C. TGF-beta 1, TGF-beta 2, and TGF-beta 3 exhibit distinct patterns of expression during cranial suture formation and obliteration in vivo and in vitro. **Journal of Bone and Mineral Research**. v.12, n.3, p.301-310, 1997.

PASSOS-BUENO, M. R. A; JEHEE, F. S; FANGANIELLO, R.D; YEH, E. Genetics of Craniosynostosis: Genes, Mutations and Getotype-Phenotype Correlations. In: RICE, D.P (Ed.). **Craniofacial Sutures: Development, Disease and Treatment**. London: Karger, v. 12, 2008. p. 107-243.

POMEROY, G. C; MAINE, S. P; PIKE, R. H. Current Concepts Review - Acquired Flatfoot in Adults Due to Dysfunction of the Posterior Tibial Tendon. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 81-A, p. 1173-82, 1999.

POSTHUMUS, M; SEPTEMBER, A. V; SCHWELLNUS, M. P; COLLINS, M. Investigation of the Sp1-binding site polymorphism within the COL1A1 gene in participants with Achilles tendon injuries and controls. **Journal of the Science and Medicine in Sport**, v. 12, n. 1, p. 184-189, 2009a.

POSTHUMUS, M; SEPTEMBER, A.V; O'CUINNEAGAIN, D. The COL5A1 gene is associated with increased risk of anterior cruciate ligament ruptures in female participants. **American Journal of Medical Genetics**, v. 37, n. 11, p. 2234-40, 2009b.

POSTHUMUS, M; COLLINS, M; COOK, J. Components of the transforming growth factor-beta family and the pathogenesis of human Achilles tendon pathology--a genetic association study. **Rheumatology**, v. 49, n. 11, p. 2090-7, 2010.

RALEIGH, S. M; VAN DER MERWE, L; RIBBANS, W. J; SMITH, R. K; SCHWELLNUS, M. P; COLLINS, M. Variants within the MMP3 gene are associated with Achilles tendinopathy: possible interaction with the COL5A1 gene. **British Journal of Sports Medicine**, v. 43, n. 7, p. 514-20, 2009.

RILEY, G. The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective. **Rheumatology**, v. 43, p. 131-142, 2004.

ROJAS-PEÑA, M. L; OLIVARES-NAVARRETE, R; HYZY, S; ARAFAT, D; SCWARTZ, Z; BOYAN, B. D; WILLIAMS, J; GIBSON, G. Characterization of Distinct Classes of Differential Gene Expression in Osteoblast Cultures from Non-Syndromic Craniosynostosis Bone. **Journal of Genomics**, v. 2, p. 121-130, 2014.

ROTH, D. A; LONGAKER, M. T; MCCARTHY, J. G; ROSEN, D. M; MCMULLEN, H. F; LEVINE, J. P; SUNG, J; GOLD, L. I. Studies in cranial suture biology: Part I. Increased immunoreactivity for TGF- β isoforms (β 1, β 2, and β 3) during rat cranial suture fusion. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 12, p. 311-321, 1997.

ROZARIO, T; DeSIMONE, D. W. The extracellular Matrix In Development and Morphogenesis: A Dynamic View. **Developmental Biology**, v. 341, n. 1, p. 126-140, 2010.

RUBIN, E; FARBER, J. L. **Patologia**. 3^a.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2002.

SAUNDERS, C.J; VAN DER MERWE, L; POSTHUMUS, M; COOK, J; HANDLEY, C.J; COLLINS, M; SEPTEMBER, A.V. Investigation of variants within COL27A1 and TNC genes and Achilles tendinopathy in two populations. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 31, n. 4, p. 898-903, 2013.

SALLES, J.I; AMARAL, M.V; AGUIAR, D.P; LIRA, D.A; QUINELATO, V; BONATO, L.L; DUARTE, M.E; VIEIRA, A.P; CASADO, P.L. BMP4 and FGF3 haplotypes increase the risk of tendinopathy in volleyball athletes. **Journal of the Science and Medicine in Sport**, v. 18; n. 2; p. 150-5, 2013.

SLATER B. J; KWAN M. D; GUPTA, D. M; LEE, J. K; LONGAKER, M. T. The role of regional posterior frontal dura mater in the overlying suture morphology. **Plastic Reconstruction Surgery**, v. 123; n. 2; p.463-469, 2009.

SEPTEMBER, A.V; POSTHUMUS, M; VAN DER MERWE, L; SCHWELLNUS, M; NOAKES, T.D; COLLINS, M. The COL12A1 and COL14A1 genes and Achilles tendon injuries. **International Journal of Sports Medicine**, v. 29, n. 2, p. 257-264, 2008.

SEPTEMBER, A.V; COOK, J; HANDLEY, C.J; VAN DER MERWE, L; SCHWELLNUS, M. P. Variants within the COL5A1 gene are associated with Achilles tendinopathy in two populations. **British Journal of Sports Medicine**, v. 43, p. 357-365, 2009.

SEPTEMBER, A.V; NELL, E.M; O'CONNELL, K; COOK, J; HANDLEY, C.J; VAN DER MERWE, L; SCHWELLNUS, M; COLLINS, M. A pathway-based approach investigating the genes encoding interleukin-1 β , interleukin-6 and the interleukin-1 receptor antagonist provides new insight into the genetic susceptibility of Achilles tendinopathy. **British Journal of Sports Medicine**, v. 45, n. 13, p. 1040-7, 2011.

SPATER, D; HILL, T.P; O'SULLIVAN, R.J; GRUBER, M; CONNER, D.A; HARTMANN, C. Wnt9a signaling is required for joint integrity and regulation of Ihh during chondrogenesis. **Development**, v. 133, p. 3039 -3049, 2006.

STEPIEN-SLODKOWSKA, M; FICEK, K; EIDER, J; LEONKA-DUNIEC, A; MACIEJEWSKA-KARLOWSKA, A; SAWCZUK, M; ZAREBSKA, A; JASTREBSKI, Z; GREINDA, A; KOTARSKA, K; CIESZCZYK, P. The +1245G/T polymorphisms in the collagen type 1 alpha 1 (COL1A1) gene in polish skiers with anterior cruciate ligament injury. **Biology of Sport**, v. 30, n. 1, p. 57-60, 2013.

STEPIEN-STODKOWSKA, M; FICEK, K; MACIEJEWSKA-KARLOWSKA, A; SAWCZUK, M; ZIETEK, P; KRÓL, P; ZMIJEWSKI, P; POKRYWKA, A; CIESZCZYK, P. Overrepresentation of the COL3A1 AA genotype in Polish skiers with anterior cruciate ligament injury. **Biology of Sport**, v. 32, n. 2, p. 143-7, 2015.

TEERLINK, C. C; CANNON-ALBRIGHT, L. A; TASHIIAN, R. Z. Significant association of full-thickness rotator cuff tears and estrogen-related receptor- β (ESRRB). **Journal of Shoulder and Elbow Surgery**, v. 24, n. 2, doi: 10.1016/j.jse.2014.06.052, 2014.

TULLY, L. J; MURPHY, A. M; SMITH, R. K. W; HULIN-CURTIS, S. L; VERHEYEN, K. L. P; PRICE, J. S. Polymorphisms in TNC and COL5A1 genes are associated with risk of superficial digital flexor tendinopathy in National Hunt Thoroughbred racehorses. **Equine Veterinary Journal**, v. 46, n. 3, p. 289-293, 2014.

VALENTIN, M; DUCARME, G; YVER, C; VUILLARD, E; BELARBI, N; RENIER, D; LUTON, D. Trigenocephaly and valproate: a case report and review of literature. **Prenatal Diagnosis**, v. 28, n.3, p. 259-61, 2008.

VINCENTI, M. P; WHITE, L. A; SCHROEN, D. J; BENBOW, U; BRINCKERHOFF, C. E. Regulating expression of the gene for matrix metalloproteinase-1 (collagenase): mechanisms that control enzyme activity, transcription and mRNA stability. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene**, v. 6, p. 391-411, 1996

WEBER, I; NINKOVIC, M; JANICKE, A; UTERMANN, B; WITSCH-BAUMGARTNER, M. Molecular analysis of 74 patients with craniosynostosis. **European Journal of Human Genetics**, v. 9, sup. 1, p. 409, 2001.

WILKIE, A. O. M; MORRIS-KAY, G.M. Genetics of craniofacial development and malformation. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 6, p. 458-68, 2001.

WINFIELD, H; JAWORSKY, C. Connective Tissue Diseases. *In* ELDER, D. E; ELENITSAS, R; JOHNSON, B; MURPHY, G. F; XU, G. **Lever's Histopathology of the Skin**. 10. ed. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins, 2008, p. 329.

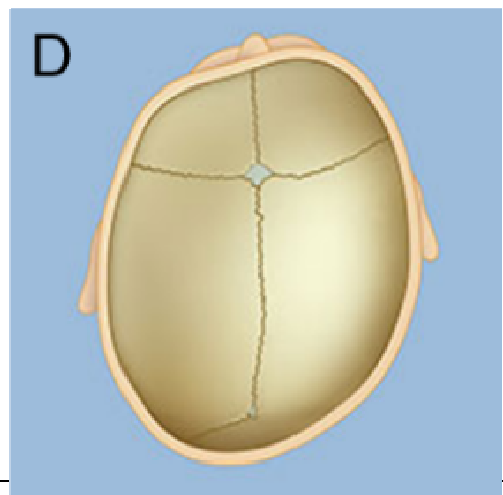
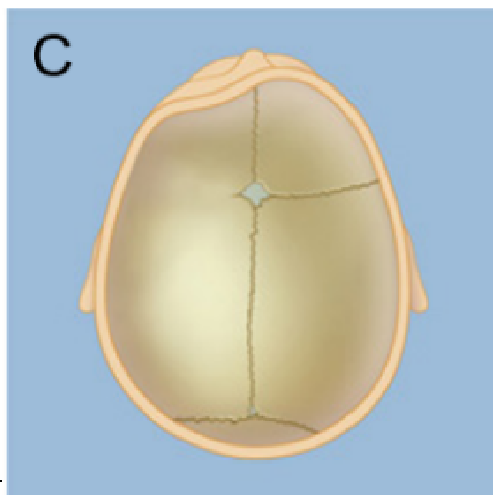
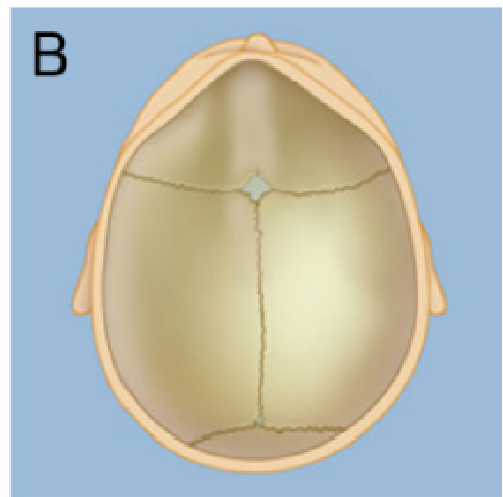
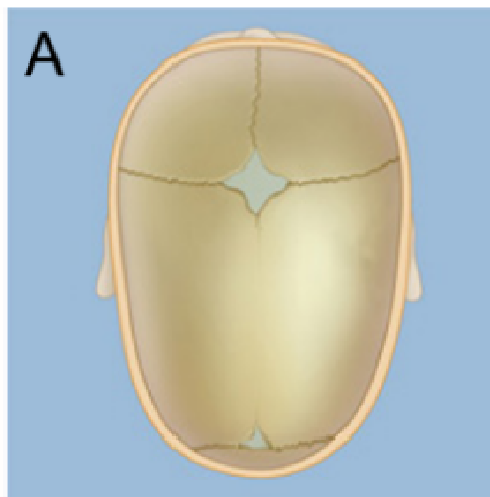
YAMAKAWA, K; YANAGI, H; SAKU, K; SASAKI, T; SHIMAKURA, Y; KAWAI, K; TSUCHIYA, S; TAKADA, K; NAITO, S. Family studies of the LDL receptor gene of relatively severe hereditary hypercholesterolemia associated with Achilles tendon xanthomas. **Human Genetics**, v. 86, n. 5, p. 445-9, 1991.

ZHOU, H; MAK, W; KALAK, R; STREET, J; FONG-YEE, C; SHENG, Y; DUNSTAN, C.R; SEIBEL, M.J. Glucocorticoid-dependent Wnt signaling by mature osteoblasts is a key regulator of cranial skeletal development in mice. **Development**, v. 136, n. 3, p. 427-36, 2009.

APÊNDICE 1

Classificação das craniossinostoses

Tipos	Suturas envolvidas
<p>Simples</p> <ul style="list-style-type: none"> • Braquicefalia • Escafocefalia • Trigonicefalia • Plagiocefalia 	<p>Coronal ou lambdoide</p> <p>Sagital</p> <p>Metópica</p> <p>Unilateral coronal ou lambdoidal</p>
<p>Compostas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Acrocefalia (oxicefalia) • Kleeblattschadel (Dufresne, 1992) 	<p>Todas as suturas OU coronárias mais quaisquer outras</p> <p>Múltiplas ou todas</p>



FORMAS DE CRANIOSSINOSTOSE. A, escafocefalia; B, trigonocefalia; C, plagiocefalia unilateral coronal e D, plagiocefalia unilateral lambdoidal. Adaptado de SOUWEIDANE *et al.*, 2015.

ANEXOS

Anexo 1



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 10/03/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 0901/09, intitulado: " **PAPEL DO POLIMORFISMO DOS GENES QUE EXPRESSAM AS METALOPROTEASES NA TENDINOPATIA PRIMÁRIA DO TENDÃO TIBIAL POSTERIOR.**" apresentado pelo Departamento de **ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

CAPPesq, 11 de Março de 2010

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua
Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011
3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Anexo 2

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP e UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ- UFPR**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL**

1. NOME:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA DE NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO:..... CIDADE

CEP:..... TELEFONE: (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL.....

Grau de parentesco

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐

DATA DE NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO:..... Nº APTO:.....

BAIRRO:..... CIDADE:

CEP:..... TELEFONE: (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: *Papel do polimorfismo dos genes que expressam as metaloproteases na tendinopatia primária do tendão tibial posterior.*

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP e UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ- UFPR

➤ As lesões dos tendões por degeneração têm explicações ligadas a traumatismos, a problemas de circulação sanguínea e problemas dos nervos, mas muitas doenças que levam à degeneração dos tendões ainda permanecem sem uma explicação médica adequada. Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa esclarecer os motivos que causam as degenerações dos tendões do pé. Por esse motivo, a possibilidade de causas genéticas para essas lesões precisam ser estudadas e o objetivo desse estudo é investigar a frequência dos genes em pacientes com diagnóstico de lesão do tendão tibial posterior, para verificar a possível relação entre o polimorfismo genético e o desenvolvimento dessa doença.

➤ Esse estudo será feito com um único exame mediante coleta simples de saliva. Os pacientes selecionados farão bochecho com água e açúcar e, em seguida, cuspirão em um recipiente plástico pequeno. A leitura das informações genéticas presentes na saliva é exame de alta tecnologia não rotineiro no nosso meio. Não haverá outros exames ou procedimentos invasivos.

➤ Não haverá desconfortos ou riscos na coleta e execução desse exame.

➤ Em relação aos benefícios para os participantes, não há benefício direto para o participante; trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que fatores genéticos interfiram na degeneração dos tendões.

➤ Com esse estudo, poderemos concluir a presença de algum benefício aos pacientes.

➤ Está garantido o acesso, em qualquer etapa do estudo, aos achados da pesquisa, ao seu prontuário e aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

Os responsáveis pelo estudo são o Prof. Dr. Túlio Diniz Fernandes e a Profa Dra. Maria Cristina Leme Godoy dos Santos, que podem ser encontrados respectivamente nos endereços: Rua Ovídio Pires de Campos, nº 333, 3º andar, sala da Secretaria de Graduação, Instituto de Ortopedia e Traumatologia da USP,

São Paulo, Capital, Brasil, pelo telefone 11-30696888 e Av. Cel. Francisco H dos Santos, s/n., Jardim das Américas, Departamento de Biologia Celular, sala 224, Curitiba, Paraná, Brasil pelo telefone 41-33611750.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) à Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar, telefone 3069 6442, ramais 16, 17, 18 ou 20. FAX: 3069 6442, ramal 26. *E-mail*: cappesq@hcnet.usp.br

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

É garantido aos participantes o direito de confidencialidade das informações obtidas no estudo, as quais serão analisadas em conjunto com as de outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum deles.

É garantido o direito aos participantes de serem mantidos atualizados sobre os resultados parciais das pesquisas ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas, nem compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Há compromisso absoluto do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo *“Papel do polimorfismo dos genes que expressam as metaloproteases na tendinopatia primária do tendão tibial posterior”*.

Eu discuti com o Dr. Túlio Diniz Fernandes sobre a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a

tratamento hospitalar, quando necessário. Concordo, voluntariamente, em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

_____ Data ____/____/____
Assinatura do paciente / representante legal

_____ Data ____/____/____
Assinatura da Testemunha

(para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.)

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____ Data ____/____/____
Assinatura do responsável pelo estudo

Anexo 3



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de Projeto: CEP-FM 081/2009.

Título: "Investigação da etiologia do retardo mental síndrômico".

Pesquisador Responsável: Iris Ferrari.

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo (s) de pesquisador (es).

Data de entrega: 13/10/2009.

Proposição do (a) relato (a)

(X) Aprovação

() Não aprovação.

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UNB: 28/10/2009.

Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UNB: 25/11/2009.

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR** "ad referendum", conforme parecer do (a) relator (a) o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

1. Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
2. O (s) pesquisador (es) deve (m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília, 26 de Novembro de 2009.



Prof. Elaine Maria de Oliveira Alves
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Medicina-UnB

Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, DF – CEP 70910-900
Telefone/Fax: (61) 3307 2276

Anexo 4

Hospital Universitário de Brasília
Secretaria de Estado de Saúde-SES
Universidade Católica de Brasília
Projeto de parceria Núcleo de Genética SES-DF, Ambulatório de Genética
HUB/UnB e Universidade Católica de Brasília

Projeto de Pesquisa: Implantação de um modelo baseado em Centros de Alta Tecnologia para o Diagnóstico Citogenético voltado aos serviços públicos em Genética do Distrito Federal

Responsáveis: Prof^a. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira (61-34487176)
Prof^a. Juliana Forte Mazzeu (61- 34487222)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Resolução 196/96)

Eu, _____
abaixo assinado, declaro ter ouvido e compreendido o presente termo de consentimento, que informa o seguinte:

Meu filho(a) _____
está participando de minha livre e espontânea vontade, de uma pesquisa que visa avaliar a contribuição de diferentes testes genéticos no diagnóstico de doenças genéticas.

A pesquisa será realizada a partir de análise de prontuários e amostra de sangue periférico.

1. A pesquisa requer a coleta de 4-8 mL de sangue periférico com seringa e agulha descartáveis. A coleta está prevista para uma única vez mas poderão ser necessárias outras coletas a critério médico.

2. Tenho garantido antes e durante o curso da pesquisa, esclarecimentos sobre o procedimento e metodologia.
3. Tenho assegurado o direito de abandonar a participação na pesquisa a qualquer momento, se assim desejar, bastando para isso comunicar a minha decisão ao líder do projeto.
4. Está prevista a publicação dos resultados dessa pesquisa em relatórios parcial e final às instituições envolvidas (Universidade Católica de Brasília e Hospital de Apoio) e publicação em congressos e revistas científicas. Além disso, tenho garantido a não-utilização desses dados por qualquer outro projeto de pesquisa.
5. O material coletado será utilizado apenas para a pesquisa em questão ficará sob a guarda do pesquisador responsável.
6. O presente termo de consentimento foi elaborado em duas vias, sendo que uma cópia ficará comigo e a outra com a responsável da pesquisa.
7. No caso de terem sido tiradas fotografias
 - a. () Concordo que sejam utilizadas em publicações científicas, se necessário
 - b. () Concordo que sejam apresentadas em aulas para profissionais da saúde.
 - c. () Não concordo que sejam incluídas em qualquer tipo de publicação ou apresentação

Brasília, ____ de _____ de 20__.

Responsável

Pesquisador

Testemunha